

# Einfluss alveolär rekrutierter Exsudatmakrophagen auf die LPS-induzierte pulmonale Inflammation in vivo

---

**Tannaz Shafiei Tabar**



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition linguistique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

**Einfluss alveolär rekrutierter Exsudatmakrophagen  
auf die LPS-induzierte pulmonale Inflammation  
in vivo**

**INAUGURALDISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Tannaz Shafiei Tabar**

aus Teheran

Gießen 2013

Aus dem medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Gießen,

Leiter: Prof. Dr. med. Werner Seeger

**Gutachter:** Prof. Dr. med. Jürgen Lohmeyer

**Gutachter:** Prof. Dr. med. Wolfgang Weidner

**Tag der Disputation:** 27.01.2014

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>4</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
1.1 Pneumonie und ARDS	7
1.2 Pathophysiologie der pulmonalen Inflammation	7
1.3 Die CCL2-CCR2-Achse in der pulmonalen Inflammation	8
1.4 Zirkulierende Blutmonozyten	11
1.5 Mausmodell der pulmonalen Inflammation	13
1.6 Ziel der Arbeit	14
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>15</b>
2.1 Material	15
2.1.1 Geräte	15
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3 Verwendete Lösungen	18
2.1.3.1 Lipopolysaccharid (LPS)	18
2.1.4 Antikörper	18
2.1.5 Versuchstiere	19
2.1.5.1 Wildtypmäuse	19
2.1.5.2 Empfängermause im Chimärenmodell	19
2.1.5.3 CCR2-defiziente Mäuse	19
2.1.5.4 Fraktalkine-Rezeptor defiziente Mäuse (CX3CR1-GFP/GFP)	20
2.1.5.5 CX3CR1 <sup>+/GFP</sup> Mäuse	20
2.1.5.6 Chimäre Mäuse	21
2.1.5.6.1 Bestrahlungsregime	22
2.1.5.6.2 Isolation und Aufarbeitung der Knochenmarkszellen	22
2.1.5.6.3 Knochenmarkstransplantation	23
2.1.5.7 Adoptiver mononukleärer Zell-Transfer	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Tierexperimenteller Versuchsabschnitt	24
2.2.1.1 Narkose	26
2.2.1.2 Durchführung des Limulus-Amöbozytenlysat-Assays zur Bestimmung der LPS-Kontamination	26
2.2.1.3 Intratracheale Instillation von Lipopolysaccharid (LPS)	26
2.2.2 Durchführung der Blutentnahme	27
2.2.2.1 Gewinnung von Blutleukozyten	28
2.2.2.2 Gewinnung von Blutserum	28
2.2.3 Durchführung der bronchoalveolären Lavage (BAL)	29
2.2.3.1 Vorbereitung und Gewinnung der Lavage	29
2.2.3.2 Zählung der Zellen der BAL	29
2.2.4 Untersuchung der Permeabilität der Blut-Lungenschranke mittels intravenöser Gabe von FITC-Albumin	30
2.3 Histologie	31
2.3.1 Präparation der Lungen	31
2.3.2 Anfertigung und Anfärbung von Lungenschnitten	31

2.3.3	Beurteilung der Lungenschnitte	31
<b>2.4</b>	<b>Anfertigung von Zytozentrifugenpräparaten</b>	<b>32</b>
2.4.1	Zentrifugation der BAL	32
2.4.2	Pappenheim-Färbung des Zytopräparates	32
2.4.3	Lichtmikroskopische Beurteilung der BAL	32
<b>2.5</b>	<b>Durchflußzytometrie</b>	<b>33</b>
2.5.1	Durchflußzytomterisches Messprinzip	33
2.5.2	Durchflussszytometrische Analyse des Antigenprofils von Spender- vs. Empfängerzellen im Blut anhand des CD 45 –Alloantigen-Musters	34
2.5.3	Durchflussszytometrische Analyse des Antigenprofils von Spender- vs. Empfängerzellen in der BAL	34
2.5.4	Prinzip der durchflußzytometrischen Zellseparation	35
2.5.5	Separation der mittels BAL und Blutentnahme gewonnenen Zellen	36
<b>2.6</b>	<b>Quantifizierung der Zytokinsekretion mittels ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)</b>	<b>37</b>
<b>2.7</b>	<b>PCR</b>	<b>37</b>
<b>2.8</b>	<b>Statistik</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Dosis- und Zeitabhängigkeit der durch intratracheal instilliertes LPS ausgelösten pulmonalen Inflammation</b>	<b>38</b>
3.1.1	Untersuchungen der brochoalveolären-Lavage(BAL)-Flüssigkeit	38
3.1.2	Untersuchungen der alveolo-kapillären Schrankenstörung	41
3.1.3	Histologische Analysen der Lungen	43
3.1.4	Vergleich der BALF Differentialzytologie von Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS	44
3.1.5	Vergleich der alveolo-kapillären-Schrankenstörung in Wildtyp- und CCR2-defizienten-Mäusen nach 50µg LPS-Gabe	47
3.1.6	Vergleichende Lungen-Histologie mit 50µg LPS behandelter Wildtyp- und CCR2-defizienter Mäuse	49
3.1.7	Vergleich der BALF Konzentrationen der Chemokine KC und MIP-2 von Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen nach LPS Gabe	51
<b>3.2</b>	<b>Vergleich der BALF Zytologie nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS in Wildtyp-, Fraktalkine-Rezeptor defizienten (FR-KO) (CX3CR1<sup>GFP/GFP</sup>) und CCR2-defizienten-Mäusen</b>	<b>52</b>
<b>3.3</b>	<b>Das chimäre Mausmodell</b>	<b>55</b>
3.3.1	Transplantations-Effizienz	55
3.3.2	Alveoläre Leukozytenrekritierung in chimären Mäusen nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS verglichen mit Wildtyp- und CCR2-defizienten-Mäusen	57
3.3.3	Vergleich der alveolo-kapillären-Schrankenstörung nach 50µg LPS-Gabe in Wildtyp-, CCR2-defizienten- und chimären Mäusen, die mit Wildtyp- oder CCR2-defizientem-Knochenmark transplantiert wurden	60
3.3.4	Histologie des Lungengewebes von Wildtyp-, CCR2-defizienten sowie chimären Mäusen transplantiert mit Wildtyp- oder CCR2-defizientem Knochenmark nach LPS-Instillation	62
<b>3.4</b>	<b>Adoptiver Transfer mononukleärer Zellen</b>	<b>65</b>
<b>3.5</b>	<b>Zytokingenexpression in FACS-separierten BAL Exsudatmakrophagen und zirkulierenden Monozyten von CX3CR1<sup>+/GFP</sup> Mäusen nach intratrachealer LPS- Instillation</b>	<b>67</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>69</b>
<b>4.1</b>	<b>Das Maus-Modell der Endotoxin-induzierten alveolären Inflammation</b>	<b>69</b>

4.2	Einfluss unterschiedlicher LPS-Dosierungen auf den Verlauf der pulmonalen Inflammation	70
4.3	Einfluss verschiedener CCR2-exprimierender Zellpopulationen auf die pulmonale Inflammation	72
4.4	Einfluss einer Fraktalkine/Fraktalkine Rezeptor abhändigen Monozyten Migration auf den pulmonalen Entzündungsprozess	76
4.5	Zytokin-Genexpressionsprofil von zirkulierenden Monozyten und Exsudatmakrophagen nach intratrachealer LPS Instillation	77
5	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	78
6	ZUSAMMENFASSUNG	79
7	ABSTRACT	82
8	LITERATURVERZEICHNIS	84
9	ANHANG	95
9.1	Danksagung	95
9.2	Lebenslauf	96
9.3	Veröffentlichung	97
9.4	Ehrenwörtliche Erklärung	98

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Ak	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillata
ARDS	acute respiratory distress syndrome
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL	CC-Chemokin Ligand
CCL2	CC-Chemokin Ligand 2 (entspricht in alter Nomenklatur: MCP-1)
CCR2	CC-Chemokinrezeptor 2
CCR2 <sup>-/-</sup>	CCR2-defizient
CCR2-KO	CCR2-defizient
CCR2-KO-KM	chimäre Wildtyp-Mäuse mit CCR2-defizientem Knochenmark
CCR2 <sup>+/+</sup>	CCR2-exprimierend
CD	Cluster of differentiation
CFU-GM	colony-forming unit, granulocyte-macrophage
CX3CR1 <sup>-/-</sup>	Fraktalkine-Rezeptor-defiziente Mäuse
d	Tage
ddCT	DeltaDeltaCT
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E.coli	Escherischia coli
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisoithiocyanat
FL	Fluoreszenz



FR-KO	Fraktalkine-Knockout-Mäuse
FSC	Vorwärtsstreulicht
G	Gauge
Gy	Gray
GFP	grün fluoreszierendes Protein
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
h	Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatocyte growth factor
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRDS	infant respiratory distress syndrom
i.v.	intravenous
IVC-racks	isoliert ventilierte Käfige
JE/MCP-1	rekombinantes murines MCP-1
KGF	Keratinocyte growth factor
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarkstransplantation
LAL	Limulus-Amöbozytenlysate-Assay
LPS	Lipopolysaccharid
Ly	Lymphozyt
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MNC	mononukleäre Zellen
mRNA	Messenger-RNA
NaCl	Natrium-Chlorid
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natural killer-Zellen
nm	Nanometer

PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pg	Pikogramm
PMN	Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt
PTP	Proteintyrosinphosphatase
rAM	Residenter Alveolarmakrophage
RANTES	Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen/min
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
s	Sekunden
S	Serum
SEM	Standard error of the mean
SPF	specific pathogen-free
SSC	Seitwärtsstreulicht
TGF-beta	Transforming growth factor-beta
TNF	Tumor Nekrose Faktor
U	Units
V	Volt
Vs.	versus
W	Watt
WT	Wildtyp
WT-KM	Chimäre Wildtyp-Mäuse mit Wildtyp-Knochenmark

# **1 Einleitung**

## **1.1 Pneumonie und ARDS**

Die ambulant erworbene Pneumonie (community acquired pneumonia/CAP) ist die weltweit häufigste Infektionskrankheit und deshalb von hoher sozialmedizinischer und ökonomischer Bedeutung (1, 2). Auslöser der ambulant erworbenen Pneumonie sind in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle bakterielle Krankheitserreger. Das akute Atemnotsyndrom des Erwachsenen (acute respiratory distress syndrom/ARDS) ist eine gefürchtete Komplikation einer Pneumonie und auch heute noch mit einer hohen Letalität verbunden (1, 3). Die Pathomechanismen der gewebschädigenden pulmonalen Inflammation sind noch unzureichend untersucht.

Die akute pulmonale Inflammation ist durch eine frühe und ausgeprägte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten aus dem Gefäßbett der Lunge über die endo-/epitheliale Barriere, in den Alveolarraum der Lunge charakterisiert (4-7). Im Gegensatz zur gut untersuchten Rolle der neutrophilen Granulozyten im Entzündungsprozess ist die Funktion der später rekrutierten Monozyten im akuten pulmonalen Entzündungsgeschehen nur unzureichend bekannt (8-10).

## **1.2 Pathophysiologie der pulmonalen Inflammation**

Forschungen der letzten Jahre haben eine Vielzahl von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen identifiziert, die an den Transmigrationsprozessen von Monozyten und neutrophilen Granulozyten ins Lungenparenchym beteiligt sind (9, 11-17).

Für Patienten mit ARDS konnte gezeigt werden, dass neben der neutrophilen Granulozyten- und Monozytenrekrutierung in den Alveolarraum die Konzentration des Chemokins CCL2 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit (BALF) deutlich erhöht ist (3). Auch beim Atemnotsyndrom des neugeborenen Kindes (IRDS) (18), bei chronischen Lungenerkrankungen (19, 20), bei der Hypersensitiväts pneumonitis (21), bei granulomatösen Lungenerkrankungen (22, 23), beim Asthma (24, 25) und in

experimentellen Sepsismodellen (26) konnten erhöhte CCL2-Spiegel in den broncheoalveolären Lavagen nachgewiesen werden.

CCL2 gehört zur Gruppe chemotaktischer Proteine aus der Chemokinfamilie, welche die Gewbsrekrutierung neutrophiler Granulozyten und Monozyten unter inflammatorischen Bedingungen steuern (27). Die Gruppe der Chemokine wird in vier Untergruppen unterteilt, welche sich in der Anzahl und Anordnung der ersten Cysteine in ihrer Aminosäurenkette unterscheiden: CC-Chemokine, wie RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted) und CCL2 (monocyte chemoattractant protein 1); CXC-Chemokine, wie Interleukin-8, C-Chemokine und CX(3)C-Chemokine (28).

Chemokine ihrerseits gehören zur Superfamilie der Zytokine und entfalten ihre chemotaktische Wirkung auf die Zielzelle durch Bindung an 7-transmembransegment-Proteine, welche ihr Signal über intrazelluläre heterotrimere G-Protein-Komplexe vermitteln (27, 29).

### **1.3 Die CCL2-CCR2-Achse in der pulmonalen Inflammation**

Das CC-Chemokin CCL2 wird von makro- und mikrovaskulären Endothelzellen der pulmonalen Strombahn, von Alveolarepithelzellen, residenten Makrophagen, zirkulierenden Monozyten, neutrophilen Granulozyten, glatten Muskelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten produziert (30-34). CCL2 weist primär chemotaktische Eigenschaften für Monozyten und Lymphozyten auf (35-38). Die primären Zielzellen des hämatopoetischen Zellsystems, welche in vivo durch CCL2 in inflammatorisch verändertes Gewebe rekrutiert werden, sind zirkulierende Blutmonozyten (17). Diese tragen auf ihrer Zelloberfläche eine homogene Verteilung des CCL2-Rezeptors CCR2 (39).

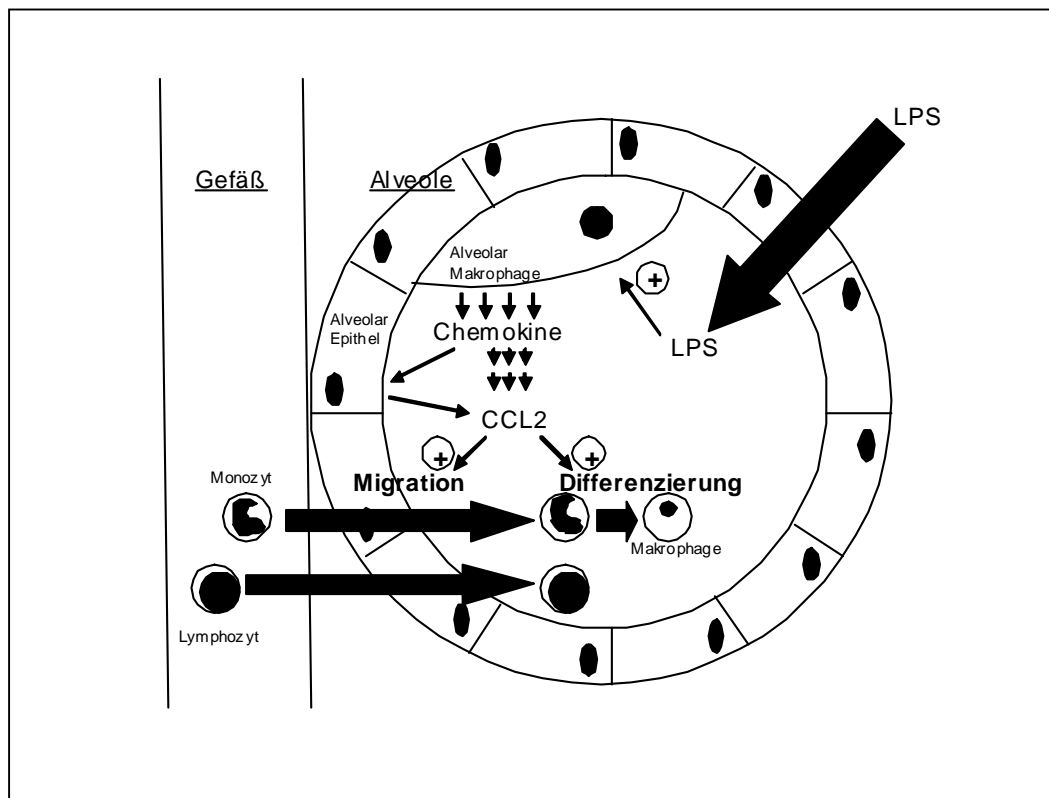
Die Abhängigkeit der inflammatorischen Akkumulation von Monozyten in verschiedenen Organsystemen von CCL2 konnte anhand von transgenen Mausmodellen nachgewiesen werden (38, 40). Für die Rekrutierung zirkulierender Monozyten aus der Blutstrombahn in die Lunge scheint die inflammatorisch induzierte CCL2 Produktion in Alveolarepithelzellen relevant zu sein (35).

Das Chemokin CCL2 ist nicht nur essentiell für die inflammatorische Rekrutierung von Monozyten, sondern es beeinflusst auch den Aktivierungszustand dieser Zellen (41). CCL2 induziert in den Monozyten eine Erhöhung des intrazellulären Kalzium-Gehaltes, die Freisetzung von Arachidonsäurederivaten und einen respiratorischen Burst (34, 41, 42).

Zusätzlich werden weitere Monozyten-Makrophagen Funktionen durch CCL2 moduliert, unter anderem durch die Steigerung der beta2-Integrinexpression (43, 44), welche an der Monozytenpassage über die endo- und epitheliale Barriere in vitro und in vivo beteiligt ist (11, 12).

CCL2 hat neben der Wirkung auf die Monozyten einen allerdings deutlich schwächeren chemotaktischen Effekt auf CD-4-positive T-Lymphozyten, basophile Granulozyten und NK-Zellen (20, 35, 40, 45, 46). Auf Alveolarmakrophagen ist CCR2 mit deutlich geringerer Dichte als auf Blutmonozyten exprimiert (30). Die Expression von CCR2 auf humanen wie auch murinen mononukleären Phagozyten wird durch inflammatorische Stimuli reguliert (31, 47, 48). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die CCL2-vermittelte wie auch eine über bakterielles Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte CCR2-Internalisierung (Liganden-abhängiges-Rezeptor-recycling) in Funktionsassays zu einer passageren Anergie der Phagozyten gegenüber dem Liganden CCL2 führt. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die Expressionsdichte des CCR2-Rezeptors im Verlauf der Monozyten-Makrophagen-Differenzierung herunterreguliert wird (30).

Die durch bakterielle Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen associated molecular pattern/PAMP) wie LPS induzierte alveoläre Monozytenrekrutierung ist strikt abhängig von der CCL2-Interaktion mit seinem Rezeptor CCR2 auf der Monozytenoberfläche (49).

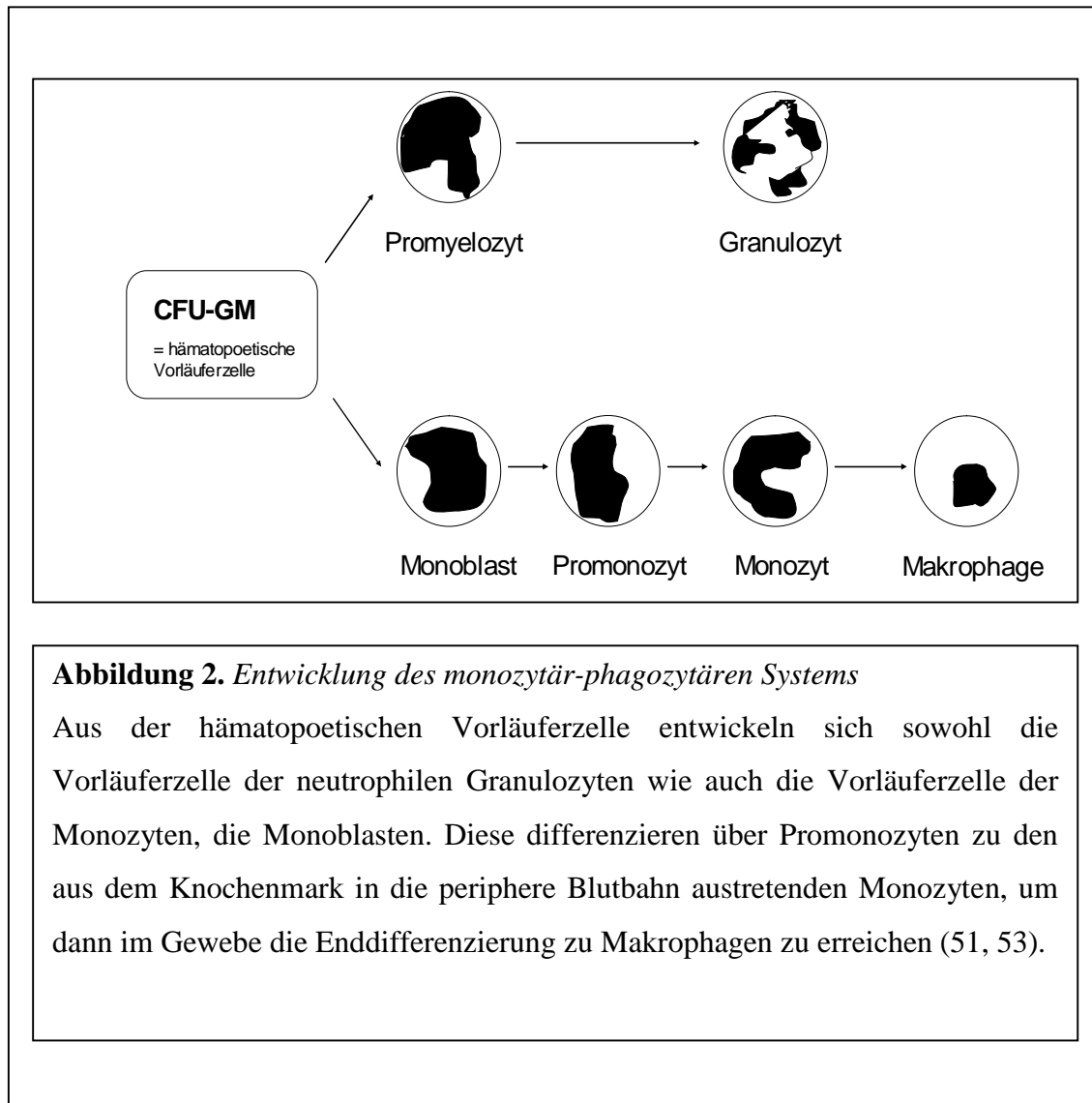


**Abbildung 1.** *Induktion, Produktion und Wirkung von CCL2.*

Der Bakterienbestandteil LPS induziert die Zytokin-Produktion der Alveolarmakrophagen, die wiederum unter anderem die Alveolarepithelzellen zur Produktion von CCL2 anregen. CCL2 wirkt sowohl migrations- wie auch differenzierungsfördernd auf Monozyten.

## **1.4 Zirkulierende Blutmonozyten**

Zirkulierende Blutmonozyten sind wichtige Bestandteile des mononukleären Phagozyten Systems (MPS), zu welchem neben Blutmonozyten die Gesamtheit der gewebetypischen Makrophagen und die dendritischen Zellen zählen (50). Zirkulierende Blutmonozyten selbst gehen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks hervor (51, 52). Die sowohl für die Neutrophilen-, als auch für die Monozytenentwicklung relevante hämatopoetische Vorläuferzelle wird als CFU-GM (colony forming unit of the granulocytic and monocytic lineage) bezeichnet, aus welcher neben Neutrophilen-Vorläuferzellen auch sogenannte Monoblasten hervorgehen (53). Monoblasten ihrerseits reifen im Knochenmark zu Promonozyten (54), welche als Vorläuferzellen zirkulierender Monozyten zu betrachten sind, die ihrerseits nach unterschiedlicher Verweildauer im Blut in Organgewebe emigrieren, wo sie zu den gewebetypischen Makrophagen ausdifferenzieren (50, 55, 56). Dieser komplexe Prozess der Monozyten-Makrophagendifferenzierung wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren reguliert (G-CSF, M-CSF, GM-CSF) (57). Eine der wichtigsten bisher definierten Funktionen zirkulierender Blutmonozyten besteht somit zweifelsfrei in ihrer Funktion als Progenitorzelle gewebetypischer Makrophagen (58). Das mononukleär-phagozytäre Zellsystem ist ein hocheffizientes Netzwerk gewebetypischer professioneller Phagozyten, das entscheidend zur angeborenen Immunität („innate immunity“) des Organismus an Grenzflächen beiträgt (59).



Die charakteristischen Veränderungen in der frühen pulmonalen Entzündungsreaktion sind bereits umfassend untersucht worden (4, 60). Hier können Monozyten eine proinflammatorische Schrittmacherfunktion übernehmen (10, 52, 61). Hierzu zählt unter anderem der Einfluss CCR2-exprimierender zirkulierender Monozyten auf die frühe und intensive Rekrutierung neutrophiler Granulozyten aus dem Gefäßbett in den Alveolarraum der Lunge (4-7, 62).

Die Rolle von Monozyten/Makrophagen bei der Terminierung der Entzündung und in der Reparaturphase ist demgegenüber unzureichend untersucht. Wie bereits von Amano et al. beschrieben, spielt diese Phase für die Wiederherstellung der Organfunktion eine entscheidende Rolle (60). Es ist bekannt, dass die frühe Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bereits den ersten Schritt zur Terminierung der pulmonalen



Entzündungsreaktion nach bakterieller Infektion darstellt. Die neutrophilen Granulozyten werden im Anschluß an die Bekämpfung der Bakterien apoptotisch und als potentielle Quelle für die Freisetzung lokaler Gewebe-zerstörende Substanzen durch Makrophagen phagozytiert (Efferozytose) (62, 63). Die pulmonale Inflammation wird durch Beseitigung der apoptotischen neutrophilen Granulozyten limitiert und terminiert (60, 62).

## 1.5 Mausmodell der pulmonalen Inflammation

Zur Charakterisierung der inflammatorischen Funktion von Monozyten im Kontext akuter pulmonaler Inflammation wurde ein Mausmodell entwickelt, welches mit Hilfe der Durchflußzytometrie ein Monitoring des Monozytenverkehrs in die Lunge unter nicht-entzündlichen sowie unter akut-entzündlichen Bedingungen erlaubt (9, 64, 65). Eine Differenzierung von konstitutiver und Entzündungs-getriebener Migration von Monozyten ist im Hinblick auf die unterschiedliche Funktion der Monozyten unter den jeweiligen Bedingungen wie bereits von Maus et al und Srivastata et al beschrieben wichtig (61, 66). In diesem Modell ließ sich zeigen, dass die alleinige Deposition von rekombinantem murinen CCL2 (JE, MCP-1) in die Lungen von Wildtypmäusen eine selektive alveoläre Monozytenakkumulation induzierte (64, 65). Demgegenüber induzierte die intratracheale Applikation von bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) von *Escherichia coli* eine starke, selbstlimitierte pulmonale Inflammation mit Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten (67).

*Escherischia coli* Bakterien gehören zu den Vertretern der Gram-negativen-Bakterien (68). Bakterien aus dieser Gruppe können schwer verlaufende nosokomiale Pneumonien mit hoher Mortalität auslösen (1, 69-73). Lipopolysaccharide sind Zellwandbestandteile Gram-negativer Bakterien, die zu den aktivsten biologischen Entzündungsstimulatoren gehören (74). Es gibt zwischen den verschiedenen *Escherischia coli* Stämmen Unterschiede im Aufbau der Lipopolysaccharide (75, 76). Aus Standardisierungsgründen wurde im Mausmodell der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation überwiegend das hoch aufgereinigte Lipopolysaccharid von *Escherischia coli* Bakterien des Serotyps O111:B4 eingesetzt (77).

Die Rolle der CCL2/CCR2 Achse für die pulmonalen Monozytenrekrutierung wurde durch vergleichende Untersuchungen an Wildtyp und CCR2-defizienten Mausstämmen sowie an Knochenmarkschimären dieser Tiere spezifiziert (27,49).

## **1.6 Ziel der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, welche Rolle alveolär rekrutierte CCR2 exprimierende Monozyten in der akuten pulmonalen Entzündungsreaktion spielen.

Hierzu wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- 1) Etablierung eines Mausmodells mit starker pulmonaler Inflammation und alveolärer Rekrutierung von Monozyten nach intratrachealer Instillation von LPS
- 2) Etablierung eines chimären Modells mit CCR2-defizienten zirkulierenden Spender-Monozyten in Wildtyp Empfänger-Mäusen
- 3) Analyse des Einflusses rekrutierter CCR2-exprimierender Monozyten auf die pulmonale Inflammation in vivo
- 4) Differenzierung proinflammatorischer und antiinflammatorischer/regenerativer Effekte alveolär rekrutierter CCR2-exprimierender Monozyten bei akuter pulmonaler Inflammation

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Brutschrank	Heraeus, D-Hanau
ELISA-Plattenphotometer	Molecular Devices, D-Ismaning
ELISA-Washer	Tecan, D-Crailsheim
Elektronenbeschleuniger 6MV	CLINAC 600C, Varian
FACSVantage Durchflußzytometer	Becton Dickinson, Mountain View, CA,USA
FACSCanto Durchflussszytometer	Becton Dickinson, Mountain View, CA,USA
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, D-Weiterstadt
Lichtmikroskop	Leica, D-Wetzlar
Mikropräparierbesteck	Hammacher, D-Solingen; Aesculap, DTuttlingen
Orthoplan Hellfeldmikroskop	Leica, D-Wetzlar
PCLYSIS Software	Becton Dickinson, D-Heidelberg
pH-Meter	Scott, D-Hofheim
Photometer	Perkin Elmer, D-Weiterstadt
Pipetten	Eppendorf, D-Hamburg; Abimed, DLangenfeld
Rüttelgerät Vortex	Janke & Kunkel, D-Staufen
Stereomikroskop	Leica MS 5 Leica, D-Wetzlar
Zentrifugen	Heraeus, D-Hanau
Zytozentrifuge	Shandon, D-Frankfurt

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Abbocath 26G Venenverweilkatheter	Abbott, Sligo, Irland
Antikörper	BD Biosciences, D-Heidelberg
Ammoniumchlorid	Sigma, D-München
Amöbozytenlysats-Assay Coatest	Chromogenix, Mölndal, Schweden
Anti-Maus CD45 Antikörper	Dako, D-Hamburg
Aqua destillata	Pharmacia & Upjohn, D-Erlangen
Bepanthen Augensalbe	Hoffmann-LaRoche, D-Grenzach-Whylen
Blutprobenröhrchen mit EDTA	KABE Labortechnik, D-Nürnberg
EDTA	Merck, D-Darmstadt
Einwegmaterial aus Polypropylen,	Eppendorf, D-Hamburg; Falcon, D-
Polyethylen, Polystyren	Heidelberg; Costar, D-Bodenheim
Ethanol 100%	Riedel-deHaen, D-Seelze
Faden, Vicryl, 4.0 und 6.0	Johnson & Johnson Intl, Belgien
FCS (Fötales Kälberserum)	Gibco, D-Karlsruhe
FITC-Albumin	Sigma, D-Deisenhofen
FITC-konjugierter Ziege-anti-Ratte-AK	Serotec, D-München
Forene® (Isofluran)	Abbott, D-Wiesbaden
Fraktalkine-Rezeptor-defizienten Mäuse	Taconic, Germantown, NY
Giemsa-Lösung	Merck, D-Darmstadt
Hämatoxylin-Eosin	Merck, D-Darmstadt
HSA (Humanes Serumalbumin)	Sigma, D-München
Injekt F 1ml-Spritze	Braun, D-Melsungen
Ketaminhydrochlorid (Ketavet®)	Pharmacia & Upjohn, D-Erlangen
Leibovitz L15-Medium	Gibco, D-Karlsruhe
LPS	Sigma, D-München
Magnesiumchlorid	Merck, D-Darmstadt
Maus TNF- $\alpha$ ELISA-Kit	R&D Systems, D-Wiesbaden
May-Grünwald-Lösung	Merck, D-Darmstadt
Methylgrünlösung	Merck, D-Darmstadt
Mikrotiterplatten, flexibel	Falcon, BD-Biosciences, D-Heidelberg

MMLV Reverse Transkriptase	Gibco, D-Karlsruhe
Natriumchlorid 0,9%	Pharmacia & Upjohn, D-Erlangen, Fresenius, D-Bad Homburg
Nylon cell stainer	BD Biosciences, D-Heidelberg
Omnican 30 1ml-Insulinspritze	Braun, D-Melsungen
Omnifix 100 Spritze (1 ml)	Braun, D-Melsungen
PBS-/- 10%	PAA, D-Cölbe
Phenol/Chlorophorm	Roth, D-Karlsruhe
PKH26-PCL mit Verdünnungslösung	Sigma, D-München
Ratte-anti-Maus-Antikörper (F4/80, CD18, CD45, CD49d)	Serotec, D-München
RNAse- freie Deoxyribonuklease I	Sigma, D-München
RNAsin	Serva, D-Heidelberg
RPMI 1640 mit und ohne GlutaMAX I	Gibco, D-Karlsruhe
Softasept-Desinfektionslösung	Braun, D-Melsungen
Sterile Kanülen	Teruma, Leuven, Belgien; Becton Dickinson, Drogheda, Irland
Sterile Skalpelle	PFM, D-Köln
TaqMan™ PCR Reaction Kit	Perkin Elmer, D-Weiterstadt
TissueTek	Sigma, D-München
TRIS	USB, Cleveland, Ohio, USA
Trypanblaulösung	Sigma, D-München
Wildtypmäuse C57BL/6	
CD45.1	Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA
CD45.2	Charles River, D-Sulzfeld
Xylazinhydrochlorid (Rompun®)	Bayer, D-Leverkusen

### 2.1.3 Verwendete Lösungen

PBS 1-fach (-/-)	PBS 1: 10 verdünnt mit Aqua. dest.	10 fach (-/-)
PBS/ EDTA als Spülflüssigkeit bei bronchoalveolärer Lavage	PBS EDTA-Versen pH	1-fach (-/-) 5 mM 7,2
Waschpuffer für Immunfluoreszenz/ FACS	PBS Mausserum	1-fach (-/-) 5 %
Verdünnung für Antikörper	PBS Mausserum	1-fach(-/-) 10 %

#### 2.1.3.1 Lipopolysaccharid (LPS)

*E. coli* Endotoxin (*E. coli* LPS, Serotyp O111:B4) wurde von Sigma, Deisenhofen, bezogen.

#### 2.1.4 Antikörper

Zur Fluoreszenzmarkierung des CD45.1-Alloantigens (Ly 5.1, Leukocyte common antigen, LCA) auf peripheren Blutleukozyten und mononukleären Phagozyten aus der bronchoalveolären Lavage wurden FITC- oder Phycoerythrin (PE)-markierte monoklonale Maus-anti-Maus-CD45.1-Antikörper (Klon A20, Isotyp Maus IgG<sub>2a</sub>) verwendet. Die Expression des CD45.2-Alloantigens (Ly 5.2, LCA) auf peripheren Blutleukozyten und Makrophagen aus der BAL wurde mit FITC-markierten monoklonalen Maus-anti-Maus-CD45.2-Antikörpern (Klon 104, Isotyp Maus IgG<sub>2a</sub>)

erfasst. Alle Antikörper und die dem Isotyp entsprechenden Kontroll-Antikörper wurden von BD Biosciences, Heidelberg, bezogen. Phycoerythrin-markiertes Annexin V wurde von BD Biosciences, Heidelberg, bezogen.

### **2.1.5 Versuchstiere**

In allen Experimenten wurden weibliche Mäuse im Alter von 10-12 Wochen mit einem Gewicht von 18-21 g verwendet. Es wurden je nach Experiment verschiedene Mausstämme eingesetzt.

#### **2.1.5.1 Wildtypmäuse**

Die Wildtypmäuse C57BL/6 mit dem Alloantigen CD45.2 (Ly5.2 Proteintyrosinphosphatase, PTP) wurden von Charles River, Sulzfeld, bezogen.

#### **2.1.5.2 Empfängermause im Chimärenmodell**

Die Empfängermause für die Knochenmarkstransplantation waren C57BL/6 Mäuse mit dem Alloantigen CD45.1 (Ly5.1 PTP) auf zirkulierenden Leukozyten und wurden von Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA, bezogen.

#### **2.1.5.3 CCR2-defiziente Mäuse**

Die CCR2-defizienten Mäuse wurden auf dem gemischten C57/BL6 x 129/Ola genetischen Hintergrund durch gezielte Zerstörung des CCR2 Gens generiert (27). CCR2-defiziente Tiere wurden dann für sechs Generationen in den genetischen C57/BL6 Hintergrund zurückgekreuzt. Die Eltern wie auch die Nachkommen der CCR2-defizienten Mäuse mit C57/BL6 Hintergrund wurden unter keimfreien Bedingungen (SPF) gezüchtet.

#### **2.1.5.4 Fraktalkine-Rezeptor defiziente Mäuse (CX3CR1-GFP/GFP)**

Die Fraktalkine-Rezeptor defizienten Mäuse CX3CR1-GFP/GFP C57/BL6 wurden von Taconic (Germantown, NY) bezogen, wo sie auf den C57/BL6 Hintergrund für 10 Generationen zurückgekreuzt wurden (78, 79).

Die Tiere wurden im zentralen Tierstall der Justus-Liebig-Universität Gießen unter SPF-Bedingungen (spezifisch pathogen freien Bedingungen) vermehrt und gehalten. Sie erhielten freien Zugang zu Wasser und Futter.

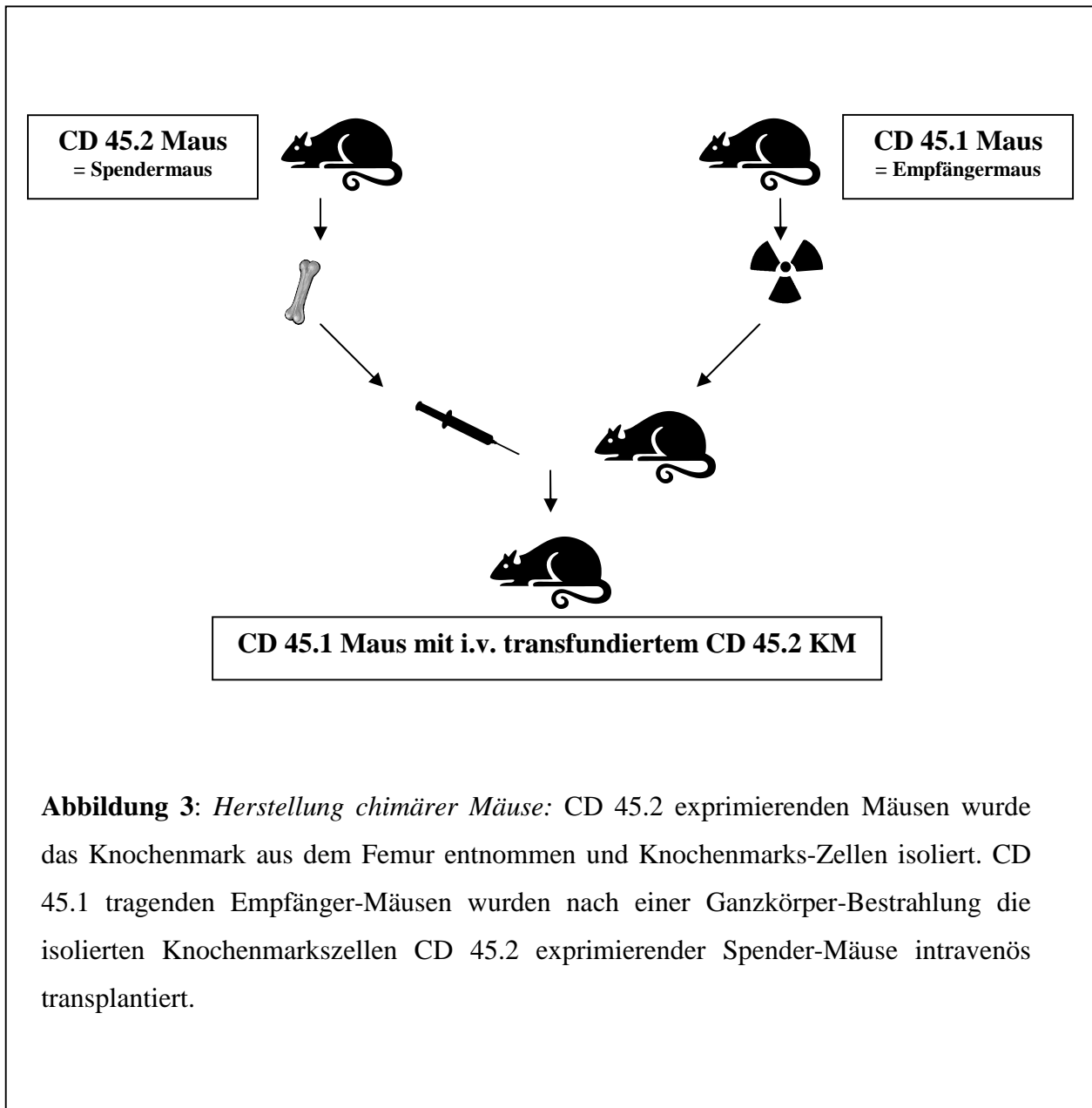
#### **2.1.5.5 CX3CR1<sup>+/GFP</sup> Mäuse**

Heterozygote CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/GFP</sup> transgene Mäuse wurden durch Kreuzungen zwischen CX3CR1-GFP/GFP C57/BL6 mit C57/BL6 Wildtyp Tieren generiert (79).



### 2.1.5.6 Chimäre Mäuse

Zur Herstellung chimärer Mäuse wurden Empfängermause mit Alloantigen CD 45.1 (Ly 5.1 PTP) Expression letal bestrahlt und mit aufgearbeitetem Knochenmark von Spendermäusen mit Alloantigen CD 45.2 (Ly 5.2 PTP) Expression transplantiert (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Herstellung chimärer Mäuse: CD 45.2 exprimierenden Mäusen wurde das Knochenmark aus dem Femur entnommen und Knochenmarks-Zellen isoliert. CD 45.1 tragenden Empfänger-Mäusen wurden nach einer Ganzkörper-Bestrahlung die isolierten Knochenmarkszellen CD 45.2 exprimierender Spender-Mäuse intravenös transplantiert.

#### **2.1.5.6.1 Bestrahlungsregime**

Die Empfängerermäuse wurden einer Ganzkörperbestrahlung mit 11 Gy eines Elektronenbeschleunigers unterzogen. Diese letale Bestrahlung der Mäuse wurde fraktioniert mit einer Pause von 3h vorgenommen, um die gastrointestinalen Komplikationen zu reduzieren (80, 81).

#### **2.1.5.6.2 Isolation und Aufarbeitung der Knochenmarkszellen**

Die Knochenmarkszellen der Spendermäuse wurden unter sterilen Bedingungen aus der Markhöhle der langen Röhrenknochen Tibia und Femur gewonnen (80).

Die Spendermäuse wurden mit einer Überdosis an Inhalationsnarkose (Isofluran) getötet. Im Anschluss wurden sie desinfiziert und durch einen kleinen Schnitt auf der dorsalen Seite des Rückens proximal des Schwanzes wurde das Fell vollständig über die Extremitäten abgezogen. Weiterhin unter sterilen Bedingungen arbeitend wurden ohne Verletzung die langen Röhrenknochen von Muskeln und Sehnen befreit und das Hüftgelenk vorsichtig aus der Pfanne luxiert. Nach Isolierung und Freipräparieren von Tibia und Femur beidseits wurde der Beckenknochen ebenfalls von Muskeln und Sehnen befreit und wie die übrigen Knochen bis zur weiteren Verarbeitung zwischen sterilen befeuchteten Kompressen aufbewahrt.

Mit einem sterilen Skalpell wurde der Knochenmarkskanal durch das Abtrennen der Epiphysen eröffnet. Dieser Kanal wurde anschließend mit 1ml RPMI 1640 + 10 % FCS pro Knochen gespült um das Knochenmark herauszulösen. Mit Hilfe einer Eppendorfpipette erfolgte die Vereinzelung der Zellen, so dass die Zellsuspension mittels eines 40 µm Nylon Cell Strainer (BD Biosciences) gefiltert werden konnte. Dieses Filtrat wurde in 5ml Leibovitz-L15 Medium aufgenommen, die Zellen wurden gezählt, abzentrifugiert (1400 rpm, 9 min, 20°C) und in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen / 150µl in Leibovitz-L 15 Medium resuspendiert.

### **2.1.5.6.3 Knochenmarkstransplantation**

Den letal bestrahlten Empfängermäusen wurden unter sterilen Bedingungen  $1 \times 10^7$  Knochenmarkszellen in sediertem Zustand in die Schwanzvene infundiert. Nach der Transplantation wurden die Mäuse in isoliert ventilierten Käfigen (IVC-Racks) mit speziellen keimfreien Bedingungen untergebracht und erhielten autoklaviertes Futter und Wasser.

### **2.1.5.7 Adoptiver mononukleärer Zell-Transfer**

CCR2-defizienten Mäusen wurden mononukleäre Wildtyp-Zellen intravenös verabreicht. Die Wildtyp-Mäuse wurden mit einer Überdosis Inhalationsnarkotikum getötet und wie unter 2.2.2 beschrieben erfolgte die Blutentnahme mit anschließender Antikoagulation.

Unter sterilen Bedingungen wurde das antikoagulierte Blut mit PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) verdünnt und anschließend vorsichtig auf ein mit Lympholyte gefülltes Probengefäß überschichtet. Nach Zentrifugation (1200 rpm, 10 min, 4°C) wurde die Interphase abpipetiert, in steriles Leibovitz-L 15 Medium überführt und erneut zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4°C). Im Anschluß wurde der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde in Leibovitz-L 15 Medium resuspendiert und danach gefiltert. Nach Bestimmung der Zellzahl im Filtrat wurden  $1 \times 10^7$  mononukleäre Zellen in CCR2-defiziente Mäusen über die Schwanzvene transfundiert.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tierexperimenteller Versuchsabschnitt

Zur Untersuchung der Funktion CCR2-exprimierender Monozyten wurden die folgenden Experimente mit 6 unterschiedlichen Mausgruppen durchgeführt. Ziel war es, die Unterschiede zwischen Wildtyp- und Chemokin-Rezeptor-defizienten Tieren sowie Knochenmarkschimären dieser Mausstämmen im Modell der Endotoxin induzierten akuten Lungenschädigung zu definieren.

#### Zusammenstellung der 6 verschiedenen experimentellen Tiergruppen:

- Gruppe 1: Wildtyp-Mäuse
- Gruppe 2: CCR2-defiziente Mäuse
- Gruppe 3: Fraktalkine-Rezeptor defiziente Mäuse
- Gruppe 4: Chimäre letal bestrahlte Wildtyp-Mäuse mit Transplantation von Wildtyp-Knochenmark
- Gruppe 5: Chimäre letal bestrahlte Wildtyp-Mäuse mit Transplantation von CCR2-defizientem Knochenmark
- Gruppe 6: CCR2-defiziente Mäuse mit adoptivem Transfer mononukleärer Blutzellen von Wildtyp-Mäusen

Gruppen	Abkürzung	Behandlungsregime	CCR2- Expressions- profil im peripheren Blut	CCR2- Expressions- profil in der Lunge
1. Wildtyp- Mäuse	WT		+++	+++
2. CCR2- defiziente- Mäuse	CCR2-KO (CCR2 <sup>-/-</sup> )		---	---
3. Fraktalkine- Rezeptor defiziente Mäuse	FR-KO (CX3CR1 <sup>-/-</sup> )		+++	+++
4. chimäre Wildtyp-Mäuse mit Wildtyp- Knochenmark	WT-KM	Letale Bestrahlung der Wildtyp-Mäuse mit Wildtyp- Knochenmarks- transplantation	+++	+++
5. chimäre Wildtyp-Mäuse mit CCR2- defizientem Knochenmark	CCR2-KO-KM	Letale Bestrahlung der Wildtyp-Mäuse mit CCR2- defizienter Knochenmarks- transplantation	---	+++
6. CCR2- defiziente Mäuse mit mononukleärer Zelltransfusion von Wildtyp- Mäusen	CCR2-KO + WT-MNCiv	CCR2-defiziente Mäuse mit intravenöser Zelltransfusion mononukleärer Wildtyp-Zellen	+++	---

**Abbildung 4:** Tabellarische Auflistung der CCR2-Expressionsprofile der experimentellen Tier Gruppen im peripheren Blut und im Lungengewebe. Für die Knochenmarkschimären und den adoptiven Zelltransfer ist das Behandlungsregime zur Generierung angegeben. Die Expressionsprofile vergleichen das Vorhandensein des CCR2-Rezeptors im peripheren Blut und in der Lunge.

+++ steht für CCR2 exprimierende Zellen und --- steht für CCR2 defiziente Zellen im untersuchten Gewebe.

### **2.2.1.1 Narkose**

Die Narkoseeinleitung erfolgte durch eine ca. 20 Sekunden andauernde Sedierung mittels einer mit Isofluran gefüllten Aetherglocke. Danach erfolgte die intramuskuläre Gabe von Xylazinhydrochlorid (Rompun®, Bayer, Leverkusen) zur tiefen Sedierung und Muskelrelaxierung. Hierfür wurde eine Endkonzentration von 6 mg/kg Körpergewicht Xylazinhydrochlorid benötigt. Die eigentliche Narkose wurde durch die intramuskuläre Gabe von 50µl einer Ketaminhydrochloridlösung (Ketavet®, Pharmacia, Upjohn) eingeleitet (Endkonzentration 50 mg/kg Körpergewicht). Während des operativen Eingriffs erfolgte die Aufrechterhaltung der Narkose durch intramuskuläre Gabe von 20-30 µl der Ketaminhydrochloridlösung.

### **2.2.1.2 Durchführung des Limulus-Amöbozytenlysat-Assays zur Bestimmung der LPS-Kontamination**

Zum Ausschluss von Endotoxinkontaminationen der verwendeten Lösungen und Präparationen wurde ein Limulus Amöbozytenlysat Assay (LAL) durchgeführt. Der Test weist sehr sensitiv und spezifisch bakterielles Endotoxin in Konzentrationen von  $> 0,015$  U/ml (1,25 pg/ml) nach. Das Test-Prinzip beruht auf der Aktivierbarkeit eines Limulusenzym durch Endotoxin, welches p-Nitro-Anilin von einem chromogenen Substrat abspaltet. Dadurch kommt es zu einem Farbumschlag, der photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm erfasst und über eine Standardkurve in Konzentrationswerte umgerechnet werden kann. Standards und Proben wurden im Duplikat gemessen. Hierzu wurden 100µl der 37°C warmen Proben, Standards und Kontrollen in 100µl LA-Lysat gegeben, nach 15 min 200µl der Substrat-Puffer-Lösung zugegeben, die ablaufende Farbreaktion nach 8 min durch die Zugabe von 100µl 20%iger Essigsäure abgestoppt und anschließend im Photometer gemessen.

### **2.2.1.3 Intratracheale Instillation von Lipopolysaccharid (LPS)**

Die Mäuse wurden wie oben beschrieben narkotisiert. Nachdem beide Augen mit Bepanthen Augensalbe versorgt worden waren um das Austrocknen vorzubeugen,

erfolgte die Fixation der Mäuse an den Extremitäten in Rückenlage. Der Halsbereich wurde mit Ethanol desinfiziert und das Fell wurde anschließend in Fellwuchsrichtung auf Höhe der Trachea abrasiert. Nach erneuter Desinfektion erfolgte eine senkrechte, in der Medianlinie des Halses ventral der Trachea geführte, ca 0,5cm lange Inzision unter stereomikroskopischer Kontrolle. Das nun unter dem Schnitt befindliche Gewebe wurde mit sterilen feinen Pinzetten stumpf dissektiert, um die Trachea frei zu legen. Nach Erlangung freier Sicht auf die Trachea erfolgte dann eine Querinzision mit einer 23G Kanüle zwischen zwei Trachealspangen. Mit Hilfe dieser Inzision konnte man einen sterilen 26G Venenverweilkatheter in die Trachea einbringen. Von dem kurz vorher angefertigten Reagenz, jeweils abhängig von dem beabsichtigten Experiment, wurde ein Volumen von 70µl in einer 1ml-Spritze (Omnifix® 100) aufgezogen und auf den Venenverweilkatheter angesetzt. Unter visueller Kontrolle der Atmung wurde langsam und fraktioniert das Volumen in die Lunge instilliert. Nach vollständiger Instillation des gesamten Volumens wurde der Venenverweilkatheter aus der Trachea entfernt. Die Wunde wurde anschließend mit einem Vicrylfaden (6,0) in zwei bis drei Stichen vernäht und sorgfältig mit Softasept Desinfektionslösung befeuchtet.

Die Tiere wurden nach Erwachen aus der Narkose in ihre Käfige zurückgebracht und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter.

Je nach Fragestellung wurden unterschiedliche Konzentrationen des Lipopolysaccharides appliziert. Das hoch aufgereinigte lyophilisierte *E. coli* O111B5-LPS (Sigma, Deisenhofen) wurde mit isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) in einer Konzentration von 1 mg/ml restituiert, aliquotiert und bei -18°C aufbewahrt, wobei dieser Schritt wie auch die folgenden Aufarbeitungen unter sterilen Bedingungen stattfanden. Es wurden intratracheale Instillationsexperimente mit einer Dosis von 1µg, 10µg und 50µg Lipopolysaccharid durchgeführt, wobei jeweils ein Gesamtvolumen von 70µl instilliert wurde. Die Kontrollgruppe erhielt eine intratracheale Instillation von 70µl isotoner Kochsalzlösung.

### **2.2.2 Durchführung der Blutentnahme**

Bei Experimenten, für die eine venöse Blutentnahme vorgesehen war, wurden die Mäuse zu definierten Zeitintervallen nach Behandlung mit LPS oder mit isotoner Kochsalzlösung durch eine überdosierte Inhalationsnarkose mit Forene (Isofluran,

Abbott) getötet. Zur venösen Blutentnahme wurde die Maus in Rückenlage fixiert und das Fell mit Softasept Desinfektionsmittel befeuchtet. Zuerst wurde mit einer Mikropräparierschere das Fell über der Bauchhöhle angehoben und eingeschnitten, daraufhin erfolgte das stumpfe Entfernen des Fells um eine klare Sicht auf die Bauchhöhle zu erhalten und diese anschließend zu eröffnen. Die Vena cava inferior wurde danach ebenfalls stumpf frei präpariert. Die Bifurkation wurde mit einer 23G Kanüle auf einer 1 ml-Spritze (Omnifix® 100) punktiert und ca. 800µl venöses Blut aspiriert.

### **2.2.2.1 Gewinnung von Blutleukozyten**

Zur Antikoagulation wurde die Blutprobe umgehend in ein EDTA-Blutprobenröhrchen (Merck, Darmstadt) überführt. Anschließend wurde dem antikoagulierten Blut 10 ml Ammoniumchloridlösung zur Erythrozytenlyse (5min bei Raumtemperatur) hinzugegeben. Die Suspension wurde 9 min bei 1400 rpm bei 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt (9min bei 1400 rpm und 4°C) wurde wiederum der Überstand dekantiert.

### **2.2.2.2 Gewinnung von Blutserum**

Das aus der Vena cava inferior aspirierte venöse Blut wurde in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt und ca. 5 min bei Raumtemperatur abgedunkelt aufbewahrt. Anschließend wurden die Eppendorfgefäße in der Eppendorf-Tischzentrifuge bei 3500 Umdrehungen pro min 15 min lang zentrifugiert. Der Überstand wird ebenfalls unter abgedunkelten Umgebungsbedingungen abpipettiert, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und erneut mit 3500 Umdrehungen pro min 8 min lang zentrifugiert. Der Überstand, welcher dem Serum entspricht, wurde abpipettiert und in einem Eppendorfgefäß bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Die Serumpräparation fand unter abgedunkelten Bedingungen statt, da das gewonnene Serum zur Ermittlung der Blut-Lungen-Schrankenstörung diente, nachdem eine Stunde



vor der Blutentnahme das lichtempfindliche FITC-Albumin intravenös in die Schwanzvene der Versuchsm Maus injiziert worden war.

### **2.2.3 Durchführung der bronchoalveolären Lavage (BAL)**

#### **2.2.3.1 Vorbereitung und Gewinnung der Lavage**

Nach erfolgter Blutentnahme (siehe 2.2.2) wurde die Hautnaht über der Trachea mit einer Mikropräparierschere entfernt und der Hautschnitt um ca. 1 cm verlängert. Mit der Schere wurde die Trachea zwischen den zwei Trachealspangen, die bei vorheriger Instillation von LPS oder 0,9% NaCl inzisiert worden war, unter stereomikroskopischer Kontrolle horizontal zu den Knorpelspangen eröffnet ohne die Trachea ganz zu durchtrennen. Eine 21G Kanüle, die vorher abgeschliffen und auf die Länge von 1,5cm verkürzt worden war, wurde in die Trachea eingeführt und mit einem Vicrylfaden (4,0) durch flüssigkeitsdichtes Umschlingen der Kanüle in der Trachea fest fixiert.

Eine 1 ml Spritze, in die zuvor 300 µl einer kalten sterilen PBS/EDTA-Lösung (EDTA-Konzentration 5 mM, pH-Wert 7,2) aufgezogen worden waren, wurde auf die als Tubus fungierende Kanüle aufgesetzt und der Spritzeninhalt wurde langsam in die Lunge instilliert. Nach der Instillation wurde dasselbe Volumen aspiriert und in zwei 10 ml Probenröhrchen/15ml Falcon Tubes auf Eis überführt. Dieser Lavage-Vorgang wurde so oft wiederholt bis in den zwei Probenröhrchen/Falcon Tubes ein BAL-Volumen von 1,5 ml bzw. 4,5 ml pro Maus gesammelt worden war.

#### **2.2.3.2 Zählung der Zellen der BAL**

Die durch die BAL gewonnene Zellsuspension wurde bei 1400 rpm und 4°C 10 min zentrifugiert. Für weitere Untersuchungen der BAL-Flüssigkeit wurden 2 Eppendorfgefäße mit je 500µl des Überstandes der zentrifugierten Zellsuspension gefüllt und bei – 20°C aufbewahrt.

Nach Verwerfen des restlichen Überstandes wurden das verbliebene Zell-Pellet der zwei Probenröhrchen/Falcon Tubes pro Maus durch Zugabe von 1ml RPMI 1640 + 10% FCS resuspendiert und in ein Probenröhrchen/Falcon Tube überführt.

Im Anschluss wurden die gewonnen Zellen in der Neubauer-Kammer gezählt, wobei Trypanblau zur Zellsuspension hinzugegeben wurde.

#### **2.2.4 Untersuchung der Permeabilität der Blut-Lungenschranke mittels intravenöser Gabe von FITC-Albumin**

Den Mäusen wurde eine Stunde vor dem Messzeitpunkt FITC-Albumin intravenös in die Schwanzvene verabreicht.

FITC-Albumin (Sigma, Deisenhofen) wurde in Portionen von 2mg/80µl aliquotiert und bei -20° gelagert. Für die Herstellung des gebrauchsfertigen Substrates wurde den Aliquots 120µl NaCl 0,9%ig zugefügt um pro Maus 1mg FITC-Albumin in 100µl Volumen verabreichen zu können (30, 49, 64). Das Volumen wurde vorsichtig unter visuellem Ausschluss von Luftbläschen langsam in die Schwanzvene infundiert. Nach Ablauf von 60 min wurden die Mäuse durch eine überdosierte Inhalationsnarkose mit Forene (Isofluran, Abbott) getötet.

Die venöse Blutentnahme wie auch die Gewinnung des Blutserums wurde bereits unter 2.2.2 ausführlich erläutert.

Die Messung der Fluoreszenz-Intensitäten in Lavage und Serum Proben erfolgte in 96-well Mikrotitrierplatte in einem Fluoreszenz-Spektrometer (Bio-Tek FL 880 microplate fluorescence reader), welches mit einer Absorption von 488nm und einer Emission von  $525 \pm 20$  nm Wellenlänge arbeitet.

Die 96-well Mikrotitrierplatten wurden mit den eingefrorenen Serum- und BAL-Proben mit jeweils 100µl Volumen befüllt.

Die Auswertung und Messung der Fluoreszenz Intensitäten erfolgten mit dem FLX-800 Programm im KC Junior, wobei der Index für die Permeabilität der Lunge definiert wurde über die Formel:

$\frac{\text{Fluoreszenz Intensität der unverdünnten BAL-Flüssigkeit}}{\text{Gemittelte Fluoreszenz Intensität der 1:10 verdünnten Seren}}$
---

## **2.3 Histologie**

### **2.3.1 Präparation der Lungen**

Nach Tötung der Tiere mit einer Überdosis des Inhalationsnarkotikums wurden diese in Rückenlage auf der Unterlage fixiert, das Fell ohne Eröffnung des Peritoneums entfernt und der Thorax vorsichtig eröffnet. Durch eine kleine Inzision in das Diaphragma ließen sich Herz und Lunge vom Thorax lösen. Die Lunge wurde über einen Zugang am rechten Ventrikel so lange mit PBS gespült, bis die Lunge ganz blutfrei (weiß) war.

Wie bei der Vorbereitung der BAL unter 2.2.3 beschrieben, wurde die Trachea eröffnet, ein Tubus eingelegt und über den Tubus die Lunge mit Tissue Tek, einer Lösung zur Herstellung von Kryopräparaten, gefüllt, bis diese nach optischer Beurteilung entfaltet aussah.

Der Tubus wurde entfernt und der Zugang zur Trachea verschlossen um ein Austreten des Tissue Tek's zu verhindern. Anschließend wurde die Lunge im Ganzen aus dem Thorax vorsichtig und ohne Verletzung ihrer Strukturen entfernt. Die frei präparierte Lunge wurde in Tissue Tek eingebettet und mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zum weiteren Verarbeiten der Lungen wurden diese bei -80°C aufbewahrt.

### **2.3.2 Anfertigung und Anfärbung von Lungenschnitten**

Aus den in Tissue Tek eingebetteten und eingefrorenen Lungen wurden im Kryomikrotom Mikroschnitte von 7µm Dicke angefertigt und anschließend mit Hämalaun-Eosin gefärbt.

### **2.3.3 Beurteilung der Lungenschnitte**

Die gefärbten Mikrokryoschnitte wurden mikroskopisch untersucht und mit dem Programm Leica QWnV3 dokumentiert. Zur Beurteilung des Grades der Inflammation und der Lungenschädigung wurden folgende Parameter analysiert: interstitielle,

intraalveoläre, bronchiale und pleurale Inflammation, Ödembildung und Thrombosierung.

## **2.4 Anfertigung von Zytozentrifugenpräparaten**

### **2.4.1 Zentrifugation der BAL**

Zur mikroskopischen Kontrolle und morphologischen Differenzierung des komplexen BAL-Zellgemisches wurden Zytozentrifugenpräparate angefertigt.

Es wurden  $10^5$  separierte Zellen in 100µl RPMI 1640 + 10% FCS aus der wie unter 2.2.3 beschriebenen aufgearbeiteten BAL-Flüssigkeit entnommen und mit Hilfe der Zytozentrifuge 5 min lang bei 500rpm auf vertikal montierte Objektträger zentrifugiert und anschließend luftgetrocknet.

### **2.4.2 Pappenheim-Färbung des Zytopräparates**

Danach erfolgte die Anfärbung nach May-Grünwald-Giemsa: Die Objektträger wurden 10 min in May-Grünwald- (Eosin-Methylenblau-) Lösung fixiert und anschließend 5 min in Giemsa- (Azur-Eosin-Methylenblau-) Lösung (10% v/v in Aqua dest.) angefärbt (Pappenheim-Färbung).

### **2.4.3 Lichtmikroskopische Beurteilung der BAL**

Die differentielle lichtmikroskopische Auszählung der prozentualen Anteile an eingewanderten Monozyten, residenten Alveolarmakrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der BAL-Suspension, wie auch die Bestimmung der Reinheit und der Morphologie der separierten Zellen erfolgte bei 100-facher Vergrößerung unter Verwendung eines Leitz-Mikroskopes.

## 2.5 Durchflußzytometrie

### 2.5.1 Durchflußzytometrisches Messprinzip

Bei der Durchflußzytometrie handelt es sich um ein computerunterstütztes Verfahren, welches die Identifizierung von Zellpopulationen durch Multiparameteranalyse ermöglicht.

Voraussetzung dieses Messprinzips ist die Vereinzelung der Zellen am Messpunkt. Diese geschieht mittels hydrodynamischer Fokussierung in einem Flüssigkeitsstrahl. Hierbei wird die Zellsuspension mittels Luftdruck aus einem Plastikröhrchen in einen Schlauch gedrückt und in eine dünne Flüssigkeitssäule eingeschlossen. Über den Schlauch gelangt diese in eine größere Flüssigkeitssäule, die als „Mantelflüssigkeit“ das Zellgemisch umgibt. Die „Mantelflüssigkeit“ weist im Verhältnis zur kleineren Flüssigkeitssäule eine höhere Fließgeschwindigkeit auf, was zur Vereinzelung und Fokussierung der Zellen im Zentrum des Flüssigkeitsstrahles führt und die Zellen perlschnurartig hintereinander liegen lässt. Jede einzelne vom Flüssigkeitszylinder umhüllte Zelle fließt nacheinander durch die Messkammer, einem sog. Laser-Intersect und wird dabei von einem Argon-Laser, welcher Licht bei 488 nm emittiert, angestrahlt. Kreuzt eine Zelle den Laserstrahl, erzeugt sie ein für ihren Zelltyp charakteristisches Streulicht. Dieses wird in mehreren Dimensionen detektiert. Die eine Messung erfolgt in Ausrichtung des Laserstrahls als sog. Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward-Scatter), im rechten Winkel dazu als Seitwärtsstreulicht (SSC = Side-Scatter). Das FSC-Streulicht gibt v.a. Auskunft über die Größe einer Zelle, während sich das SSC-Streulicht proportional zur Granularität der Zelle verhält. So erzeugt jede Zelle ein für seinen Zelltyp charakteristisches FSC- und SSC-Streulicht. Darüber hinaus können mittels Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen, die an spezifische Antikörper gebunden sind, die unterschiedlichen Zellpopulationen aufgrund ihrer Anfärbung identifiziert werden. Der monochromatische Laserstrahl führt zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes, wodurch dieser auf ein höheres Energieniveau gehoben und unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf sein Ursprungsniveau zurückfällt. Die emittierte Photonenkonzentration wird durch einen Photonendetektor registriert. Sie verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Häufig für durchflußzytometrische Analysen verwendete Fluorochrome sind das grün-

fluoreszierende Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und das gelbrot-fluoreszierende Phycoerythrin (PE). Die FITC-Fluoreszenz hat ein Emissionsmaximum bei 530 nm (FL1, grüne Fluoreszenz) und die PE-Fluoreszenz bei 575 nm (FL2, rote Fluoreszenz). Das Fluoreszenzlicht wird von Detektoren erfasst und nach der Amplifikation mit Sekundärelektronenvervielfachern (sog. Photomultipliern) wie auch in elektrische Signale konvertiert. Ebenso wie die Streulichtcharakteristika dient die Fluoreszenzmarkierung der Differenzierung von einzelnen Zellpopulationen sowohl in der bronchoalveolären Lavage und im peripheren Blut.

### **2.5.2 Durchflusszytometrische Analyse des Antigenprofils von Spender- vs. Empfängerzellen im Blut anhand des CD 45 – Alloantigen-Musters**

Die untersuchten Zellpopulationen wurden folgendermaßen immunphänotypisch differenziert: Blutmonozyten F4/80-positiv, PMN Gr-1-positiv und F4/80-negativ. Zunächst wurden 100 µl der lysierten Blutprobe in jedes Well einer Mikrotiterplatte (96er Wells) pipettiert. Die Mikrotiterplatte mit den Proben wurde dann bei 1200 rpm 3 min lang zentrifugiert. Nach Dekantieren wurde 10 µl humanes Immunglobulin G (Octagam® in einer 1:5-Verdünnung in PBS) in jedes Well hinzugegeben und die Proben für 5 min inkubiert, um die unspezifische Fc-Rezeptor-vermittelte Antikörperbindung zu blockieren. Die Zellen wurden dann einmal mit PBS gewaschen und für 30 min entweder mit PE-konjugiertem anti-CD45.1 oder mit FITC-konjugiertem anti-CD45.2 in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Die angefärbten Zellen wurden zweimal gewaschen und der FACS-Analyse zugeführt, die mit einem FACScan (Software: CellQuest; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) durchgeführt wurde.

### **2.5.3 Durchflusszytometrische Analyse des Antigenprofils von Spender- vs. Empfängerzellen in der BAL**

Die CD45-Alloantigen-Differenzierung erfolgte wie die des peripheren Blutes. Zur Analyse der Expression von CD45.1 vs. CD45.2 auf peripheren Leukozyten im Blut

unbehandelter CD45.1- und CD45.2-Mäuse oder chimärer CD45.2-Mäuse wurde ein FACScan Durchflusszytometer verwendet, das mit einem 488 nm Argon-Laser sowie der CellQuest Pro Software (BD Biosciences) ausgestattet ist. Für ausgewählte Experimente wurde die Expressionsanalyse der Marker CD45.1 vs. CD45.2 auch mit dem Durchflusszytometer FACSCanto SE durchgeführt. Dieses besitzt eine DIVA-Option für die Auswertung. Zur Feststellung der Spezifität der verwendeten Antikörper wurde im Vorfeld jeder der beiden Mausstämme (CD45.1 und CD45.2) sowohl mit dem PE-konjugiertem CD45.1-Antikörper als auch mit dem FITC-konjugierten CD45.2-Antikörper untersucht. Im Chimärenmodell wurden die Leukozyten im peripheren Blut sowie die Alveolarmakrophagen aus der BAL mit PE-konjugierten anti-CD45.1-Antikörpern angefärbt um den Spender von Empfängerzellen zu differenzieren.

#### **2.5.4 Prinzip der durchflußzytometrischen Zellseparation**

Zur Separation der residenten Alveolarmakrophagen und der in den Alveolarraum eingewanderter Monozyten wurde ein FACSVantage Durchflußzytometer mit DIVA cellsorting verwendet, welches zur Separation größerer biologischer Partikel eine MakroSort-Einrichtung besitzt. Mittels eines piezo-elektrischen Transducers wird dabei nach der hydrodynamischen Fokussierung der BAL-Zellen der umhüllende Flüssigkeitsstrahl zu Vertikalschwingungen angeregt, so dass der die Zellen umgebende Flüssigkeitsmantel im sog. Tropfenabrißpunkt (stream breakoff) in einzelne Tropfen (droplets) übergeht. Erreicht nun eine zu separierende Zelle den Tropfenabrißpunkt, so wird der gesamte Flüssigkeitsstrahl für einen kurzen Zeitpunkt elektrisch geladen und der sich ablösende Tropfen mit der darin enthaltenen Zelle erhält eine elektrische Restladung. Zwischen zwei Ablenkungsplatten (deflection plates) findet nun in einem elektrischen Feld die Deflexion des elektrisch geladenen Tropfens und damit die Separation der im Tropfen enthaltenen Zelle statt. Die separierten Zellen werden dabei in sterilen Probenröhrchen aufgefangen.

### **2.5.5 Separation der mittels BAL und Blutentnahme gewonnenen Zellen**

Für die flow-zytometrische Separation der BAL-Zellen wurde ein Durchflußzytometer verwendet, welches mit einem 5W-Argonionen Laser mit einem Laser-Output von 200 mW und einer Emissionswellenlänge von 488 nm betrieben wurde. Vor jedem Separationsvorgang erfolgte eine Sterilisierung des Probenschlauches mit 0,1%iger (w/v) Natrium-Hypochloridlösung, darauf ein Nachspülen mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Die MakroSort-Einrichtung am FACStar war folgendermaßen justiert: Der Differentialdruck wurde auf 8,5 psi (pound force per square inch = 1 bf/in<sup>2</sup> ; 1 psi = 68,95 mbar) eingestellt und der piezo-elektrische Transducer mit einer Frequenz von 17,164 kHz betrieben, so dass eine Tröpfchenverzögerung (droplet delay) von 15,2 – 15,7 Tröpfchen resultierte. Vor der Separation der Zellen erfolgte die exakte Justierung des Tröpfchenabrisspunktes durch experimentelle Separation fluoreszierender Kalibrierungsbeads, bis eine Separationsreinheit von > 99% erreicht war. Die während des Separationsvorgangs verwendete sterile Kochsalzlösung wurde mit Hilfe des oben beschriebenen Limulus-Amöbenzytenlysat-Assays (siehe 2.2.1.2) routinemäßig auf ihren Endotoxingehalt überprüft, der stets < 1,25 pg/ml Kochsalzlösung betrug.

Die Separation der einzelnen Zellpopulationen aus der BAL (alveolär rekrutierte Monozyten und residente Alveolarmakrophagen) wie auch der peripheren Blutmonozyten erfolgte jeweils nach unterschiedlichen Kriterien. Periphere Blutmonozyten und Exsudatmakrophagen der BALF wurden nach den Kriterien 1) Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) und 2) Grün-Fluoreszenz bei  $535 \pm 30$  nm (FL 1) der endogenen GFP-Markierung in CX3CR1<sup>+/GFP</sup> Mäusen separiert. Während der Zellseparation wurden die zu separierenden Zellen auf Eis inkubiert. Die Reinheit der sortierten Zellpopulationen wurde 1) durch eine „post-sort“-Analyse der separierten Zellen und 2) durch differentialzytologische Auswertung Pappenheimgefärbter Zellausstriche überprüft. Mittels einer Propidium-Iodid-Färbung und anschließender FACS-Analyse der separierten Monozyten und Alveolarmakrophagen wurde ihre Vitalität bestimmt. Sie betrug immer > 96%. Die Daten der Zellseparationsprozedur wurden computergestützt gespeichert und mit Hilfe der PCLYSYS-Software für graphische Auswertungen prozessiert.



## **2.6 Quantifizierung der Zytokinsekretion mittels ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)**

Die Quantifizierung der Zytokin-Proteinkonzentration im Serum und in der brocheoalveolären Lavage der verschiedenen Mausreihen wurde in Doppelbestimmung mittels kommerziell erhältlicher ELISA-Kits (enzyme-linked immunosorbent assay) unter Beachtung der Herstellerangaben durchgeführt. Die Absorptionsmessung erfolgte hierbei bei 500nm unter Verwendung eines ELISA-Plattenphotometers (Molecular Dynamics). Die untere bzw. obere Nachweisgrenze für TNF-alpha lag bei 5 pg bzw. 1000 pg/ml BAL.

## **2.7 PCR**

Zur Analyse der m-RNA-Expression ausgewählter Zytokine erfolgte eine real-time-PCR (RT-PCR) gesorteter GFP-positiver Monozyten. Die gesamte zelluläre RNA wurde mittels kommerziell erhältlicher RNA-isolation kits (Carl Roth) isoliert. Die Quantifizierung und Überprüfung der Reinheit wurde mittels Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Biosystems) durchgeführt. Nur RNA-Präparationen, deren Absorptionsquotient (A260/280nm) 1,90 überstieg, wurden für weitere Untersuchungen zur Amplifikation und real-time-PCR verwendet.

Experimentelle Details bezogen auf die Synthese der komplementären DNA und die Validierung der real-time PCR wurden entsprechend der aktuellen wissenschaftlichen Protokolle durchgeführt (82, 83).

## **2.8 Statistik**

Die Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM. Signifikante Differenzen zwischen Zellpopulationen wurden mit dem Mann-Whitney U-Test bestimmt. Die Differenzen wurden als statistisch signifikant betrachtet, wenn  $p < 0,05$  war.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Dosis- und Zeitabhängigkeit der durch intratracheal instilliertes LPS ausgelösten pulmonalen Inflammation**

Zur Festlegung der geeigneten LPS-Dosis und der adäquaten Messzeitpunkte im Entzündungsverlauf, die ein optimales Monitoring der pulmonalen Rekrutierung CCR2 positiver Monozyten nach intratrachealer Endotoxin Gabe erlauben, wurden die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen in Wildtyp-Mäusen durchgeführt (Abb. 5 A-D, Abb. 6, Abb 7 A-F).

##### **3.1.1 Untersuchungen der brochoalveolären-Lavage(BAL)-Flüssigkeit**

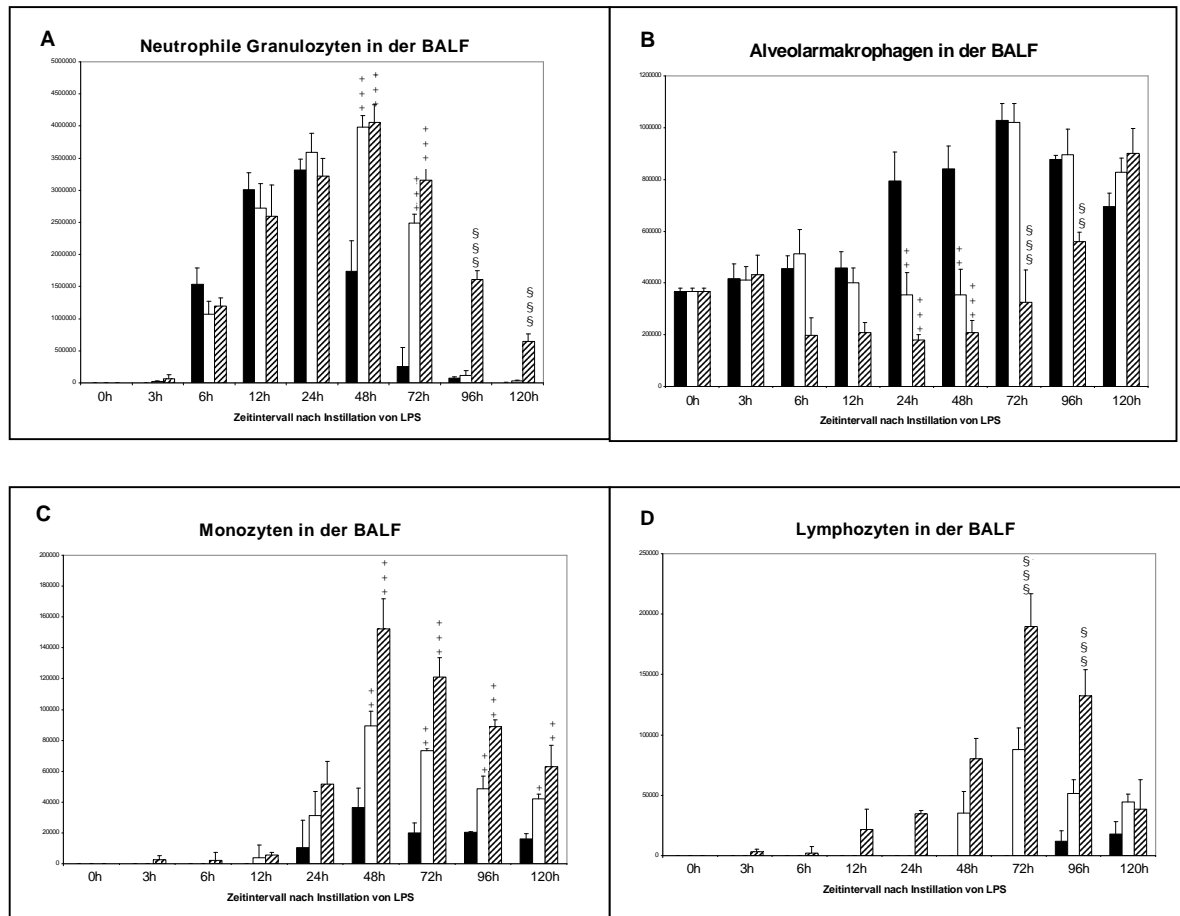
Die Abbildungen 5 A-D zeigen die zelluläre Zusammensetzung der BAL im zeitlichen Verlauf nach intratrachealer Instillation verschiedener LPS-Dosen.

Es wurden 3 Gruppen von Wildtyp-Mäusen verglichen, die jeweils mit 1µg, 10µg oder 50µg LPS intratracheal behandelt wurden. Diese wurden im Anschluss nach definierten Zeitintervallen von 0h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h lavagiert. Von der gewonnenen BALF wurden Zytozentrifugenpräparate angefertigt und differentialzytologisch ausgewertet, wobei der prozentuale Anteil neutrophiler Granulozyten, Monozyten, Alveolarmakrophagen und Lymphozyten bestimmt und anhand der Gesamtzellzahl der BALF auf absolute Zellzahlen umgerechnet wurde. Bei allen verwendeten LPS-Dosierungen wurde eine Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum beobachtet. Vor LPS Instillation waren in der BAL-Flüssigkeit keine neutrophilen Granulozyten zu finden. Nach intratrachealer Instillation von LPS stieg der Anteil der neutrophilen Granulozyten über 48 Stunden kontinuierlich an und fiel dann wieder nahezu auf Ausgangswerte ab. Bei höheren LPS-Dosen wurde das im Vergleich zu niedrigeren Dosen höhere Rekrutierungsmaximum später erreicht und der Abfall des Neutrophilenanteils in der BAL erfolgte verzögert. Für die höheren

LPS-Dosen (10µg und 50µg) stellte das 48h Intervall den Zeitpunkt der maximalen Neutrophilen Rekrutierung nach intratrachealer LPS-Gabe dar.

Abbildung B zeigt die Anzahl der Alveolarmakrophagen in der BAL-Flüssigkeit im Zeitverlauf nach LPS Gabe. Zum Zeitpunkt 0h, welcher dem Ausgangszustand einer unbehandelten Maus entspricht, war in der BAL-Flüssigkeit eine relativ konstante Anzahl von Alveolarmakrophagen vorhanden. Ab dem 12h Intervall zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den der Makrophagenzahlen der Tiere, die eine niedrige LPS-Dosis von 1µg erhalten hatten, und den Tieren, die mit LPS-Dosen von 10µg und 50µg behandelt wurden. Während es bei Instillation von 1µg nach dem anfänglichen Ansteigen der Alveolarmakrophagen-Anzahl zu einer Stagnation im 6h und 12h Intervall kam, bevor ein erneutes und erhebliches Ansteigen der Alveolarmakrophagen-Anzahl zu verzeichnen war, zeigte der Verlauf bei höheren Dosen zunächst eine Abnahme der Alveolarmakrophagen-Anzahl, bevor es zu einem erneuten Anstieg kam. Die Abnahme der Alveolarmakrophagen-Anzahl war bei Gabe von 50µg LPS am ausgeprägtesten und der erneute Anstieg am stärksten verzögert.

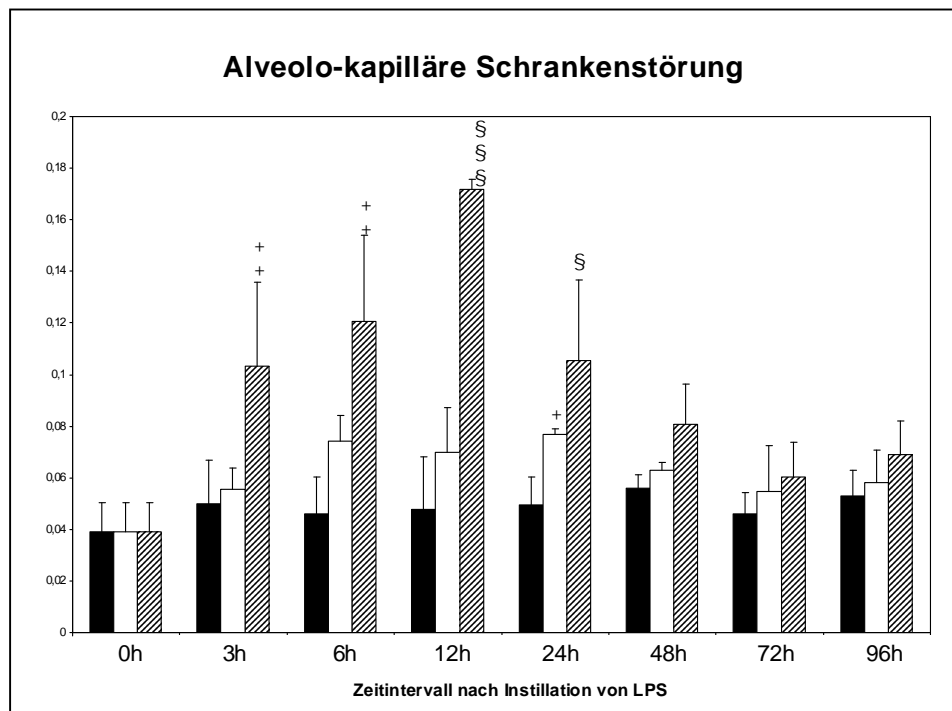
Im Vergleich zu den neutrophilen Granulozyten erfolgte die alveoläre Rekrutierung von Monozyten/Exsudatmakrophagen verzögert (Abbildung C). Je höher die verabreichte LPS-Dosis war, desto früher ließen sich die Monozyten in der BALF nachweisen, um so höher war das Maximum der Monozytenrekrutierung nach 48 Stunden und umso länger ließen sich diese Zellen in der BALF nachweisen. Abbildung D zeigt die Anzahl lymphatischer Zellen in der BALF im Zeitverlauf nach LPS Instillation. Vor LPS Gabe waren keine Lymphozyten in der BALF detektierbar. Nach intratrachealer Gabe von 1µg LPS ließen sich nach 96h und 120h Lymphozyten in der BALF nachweisen. Bei Verabreichung höherer LPS-Dosen waren Lymphozyten früher, in erhöhter Menge und länger in der BALF zu finden.



**Abbildung 5 A-D.** *LPS-Dosis abhängige Rekrutierung unterschiedlicher Leukozytenpopulationen nach intratrachealer Instillation von LPS bei Wildtyp-Mäusen.* Wildtyp-Mäuse erhielten eine intratracheale Instillation von ■1µg LPS, □10µg LPS oder ▨50µg LPS. Die absolute Anzahl der A)neutrophilen Granulozyten (PMN), B)Alveolarmakrophagen, C)Monozyten und D)Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavage nach unterschiedlichen Zeitintervallen ist dargestellt. Jeweils n=5-12; +, ++ und +, p< 0,001, p< 0,01, p< 0,05 vs 1µg LPS; §§§, §§ und §, p< 0,001, p< 0,01, p< 0,05 vs 10µg LPS

### **3.1.2 Untersuchungen der alveolo-kapillären Schrankenstörung**

Abbildung 6 zeigt die Veränderungen der alveolo-kapillären Schranke im Zeitverlauf nach intratrachealer Instillation unterschiedlicher LPS-Dosen. Gemessen wurde der Übertritt von intravenös verabreichtem FITC-Albumin in die BALF. Zum 0h Zeitpunkt war nur eine geringe FITC-Albumin Konzentration in der BALF detektierbar. Nach intratrachealer Instillation von LPS fand sich bei allen 3 verwendeten LPS-Dosierungen eine Schrankenstörung. Bei den mit 1µg LPS behandelten Wildtyp-Mäusen stieg die Konzentration von FITC-Albumin im Verlauf jedoch nur geringfügig an. Die mit 10µg LPS instillierten Tiere zeigten eine ausgeprägtere Störung der Schrankenfunktion, welche bei mit 50µg LPS instillierten Mäusen mit einem Maximum nach 12 Stunden noch deutlich stärker nachweisbar war.



**Abbildung 6:** *LPS-Dosis abhängige Veränderungen der alveolo-kapillären Schrankenstörung von Wildtyp-Mäusen.* Wildtyp-Mäuse erhielten eine intratracheale Instillation von ■1µg LPS, □10µg LPS oder ▨50µg LPS. Nach intravenöser FITC Albumin-Injektion wurde der Übertritt von FITC-Albumin in die BALF als Maß der alveolo-kapillären Schrankenstörung zu unterschiedlichen Zeitpunkten quantitativ ermittelt. n=5-12

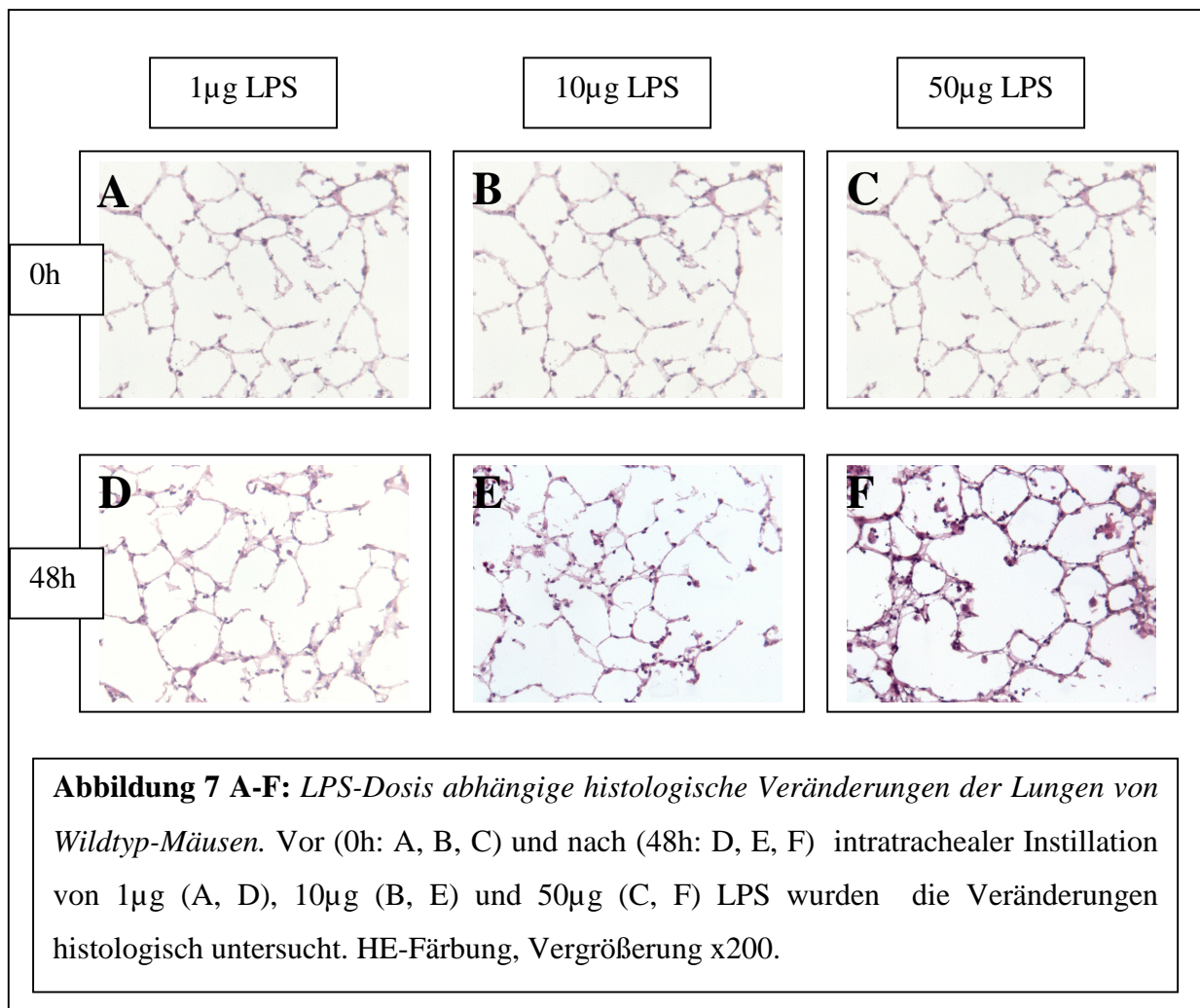
++ und +,  $p < 0,01$  und  $p < 0,05$  vs 1µg LPS;

§§§ und §,  $p < 0,001$  und  $p < 0,05$  vs 10µg LPS

### 3.1.3 Histologische Analysen der Lungen

Wildtyp-Mäusen wurde intratracheal Lipopolysaccharid (LPS) instilliert und zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (0h und 48h) nach LPS-Gabe wurden histologische Lungenschnitte, -färbungen und -mikroskopische Untersuchungen angeschlossen.

Die Lungenhistologie zum Zeitpunkt 0h (Abbildung 7 A-C) entspricht einer unbehandelten Wildtyp-Maus unter Standard Haltebedingungen. Sie zeigt eine normale Struktur des Lungenparenchyms. Die übrigen Abbildungen (Abb 7D, 7E und 7F) zeigen histologische Schnitte nach einem 48h Intervall nach 1 $\mu$ g (D), 10 $\mu$ g (E) und 50 $\mu$ g (F) LPS-Instillation. Nach LPS Gabe fand ein zellreiches Entzündungsinfiltrat der Alveolen und Alveolarsepten, wobei die histologischen Veränderungen nach 50 $\mu$ g LPS-Instillation am ausgeprägtesten waren (Abbildung 7 F).



### **3.1.4 Vergleich der BALF Differentialzytologie von Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS**

In den Abbildungen 8 A-D sind die absoluten Zellzahlen neutrophiler Granulozyten, Alveolarmakrophagen, rekrutierter Exsudatmakrophagen und Lymphozyten von Wildtyp-Mäusen und CCR2-defizienten-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS vergleichend dargestellt. Die Anfertigung und Auswertung der Zytocentrifugenpräparate erfolgte wie im Abschnitt Material und Methoden unter 2.4 beschrieben.

Abbildung 8 A zeigt die Gegenüberstellung der Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der BAL von Wildtyp-Mäusen und CCR2-defizienten Tieren. Bei unbehandelten Tieren (0h Zeitpunkt) fanden sich in beiden Mausgruppen keine neutrophilen Granulozyten in der BAL.

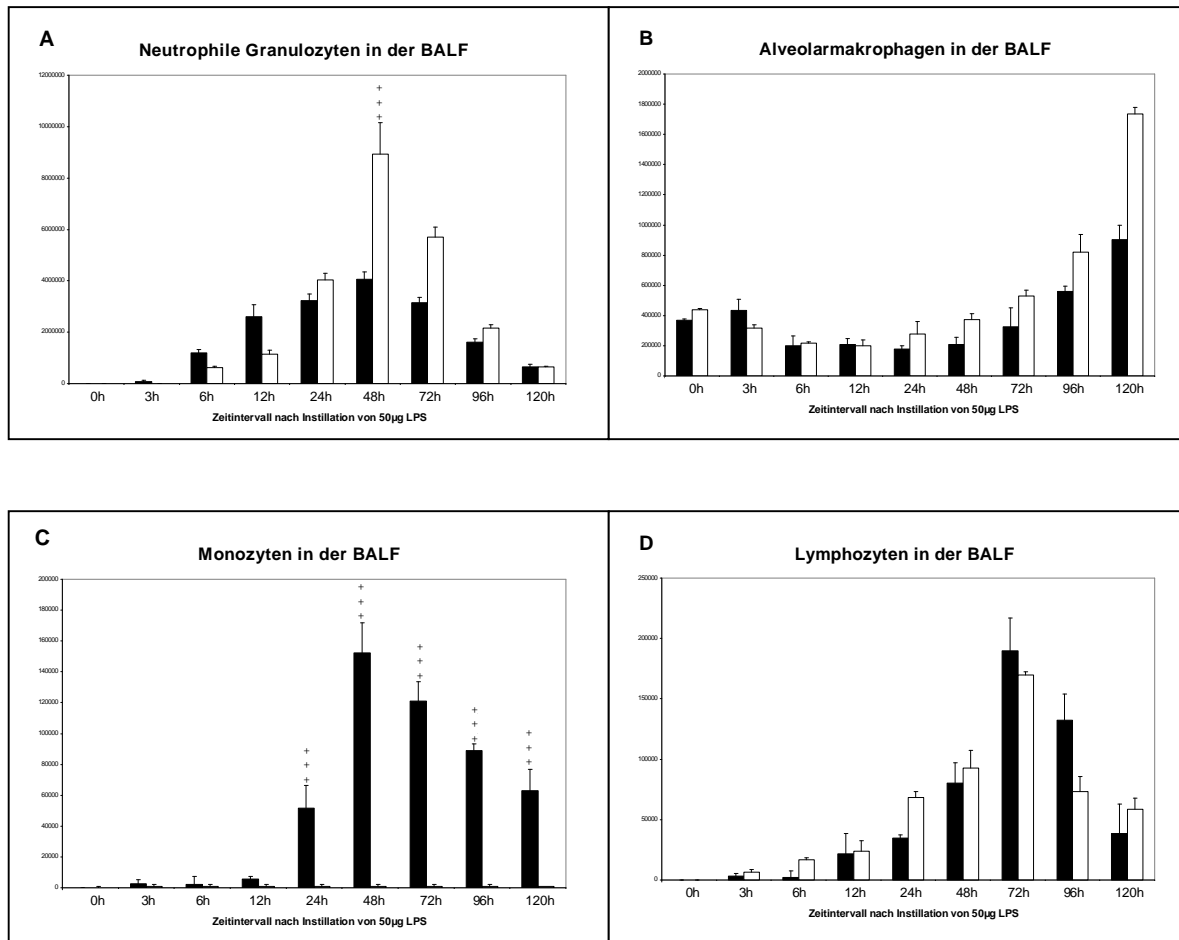
Nach Applikation von LPS kam es zu einem Ansteigen der neutrophilen Granulozyten bis zu einem Maximum, dass in Wildtyp-Mäusen mit 4,1Mio. signifikant niedriger lag als bei CCR2-defizienten Tieren mit 9Mio. Die CCR2-defizienten Mäuse zeigten außerdem eine im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen verzögerte und länger anhaltende alveoläre Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, so dass 48h nach intratrachealer Gabe von LPS die Anzahl neutrophiler Granulozyten in CCR2-defizienten Mäusen noch mehr als doppelt so hoch war wie in Wildtyp-Mäusen. In Abbildung 8 B sind die Absolutzahlen der Alveolarmakrophagen im Zeitverlauf vergleichend zwischen Wildtyp-Mäusen und CCR2-defizienten-Mäusen dargestellt.

Bei unbehandelten Tieren lag die BALF Alveolarmakrophagenanzahl in beiden Maus-Gruppen bei 0,4 Mio. Nach intratrachealer Applikation von 50µg LPS fiel die Alveolarmakrophagen-Zellzahl bis zum 12h-Zeitintervall auf 0,2 Mio. Alveolarmakrophagen ab und stieg dann wieder an. Der Anstieg der Alveolarmakrophagenzellzahl ab dem 12h Zeitpunkt erfolgte in beiden Maus-Gruppen, war jedoch bei den CCR2-defizienten-Mäusen stärker ausgeprägt. Dieser Unterschied war zum 120h Zeitpunkt mit 0,9 Mio. Alveolarmakrophagen in Wildtyp-Mäusen vs. 1,7 Mio. Alveolarmakrophagen in CCR2-defizienten-Mäusen statistisch signifikant.

In Abbildung 8C sind die Absolutzahlen alveolär rekrutierter Exsudatmakrophagen nach 50µg LPS-Gabe vergleichend zwischen Wildtyp-Mäusen und CCR2-defizienten-Mäusen dargestellt. In unbehandelten Tieren (Zeitpunkt 0h) waren in beiden Mausgruppen keine Exsudatmakrophagen in der BALF nachweisbar. Nach LPS-Gabe



kam es zu einem Ansteigen der Exsudatmakrophagen in der brocheoalveolären Lavage von Wildtyp-Mäusen, nicht aber in der brochoalveolären Lavage von CCR2-defizienten Tieren. Das Maximum der Exsudatmakrophagen in den Zytozentrifugenpräparaten von Wildtyp-Mäusen wurde mit 0,15 Mio. 48h nach LPS-Gabe erreicht, danach nahm die Exsudatmakrophagen-Anzahl in der BAL wieder langsam ab. Bei CCR2-defizienten Mäusen blieb somit die in Wildtyp-Tieren regelhafte alveoläre Rekrutierung von Exsudatmakrophagen nach LPS Gabe nahezu vollständig aus. Die Abbildung 8D zeigt die Veränderungen der Lymphozytenzahl in der BALF nach Instillation von 50µg LPS. Unbehandelt (Zeitpunkt 0h) ließen sich in beiden Mausgruppen keine Lymphozyten in der BALF nachweisen. Nach LPS-Gabe kam es zu einem stetigen Anstieg der Anzahl der BALF Lymphozyten bis zu einem Maximum von ca. 0,17Mio. in CCR2-defizienten-Mäusen und 0,19Mio. in Wildtyp-Mäusen nach 72h und danach zu einem kontinuierlichen Abfall.

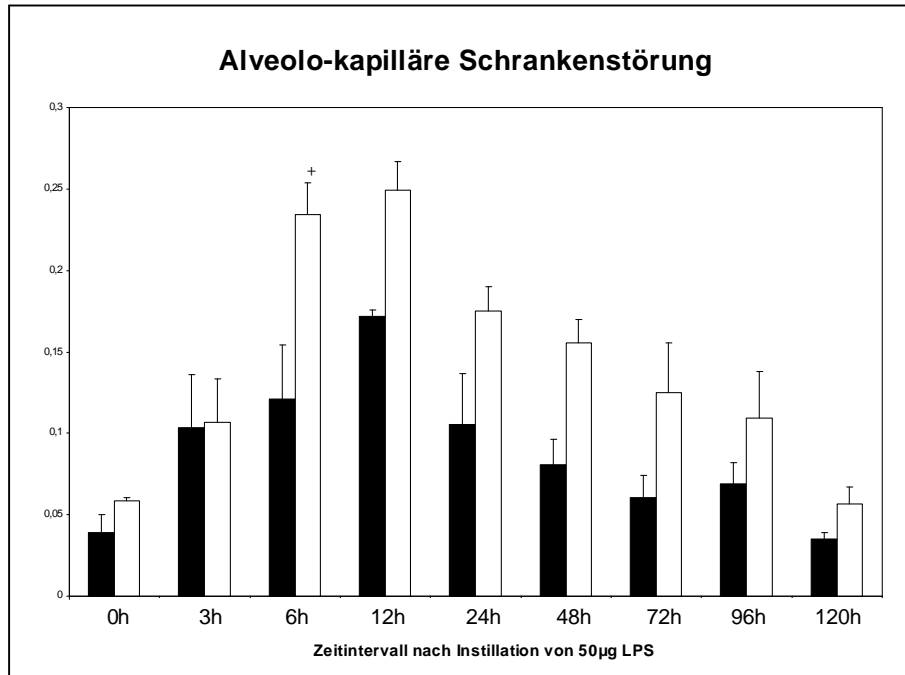


**Abbildung 8 A-D:** Vergleich der BALF Differentialzytologien in Wildtyp- und CCR2-defizienten-Mäusen im Zeitverlauf nach intratrachealer Gabe von 50µg LPS.

Wildtyp-Mäuse ■ und CCR2-defiziente-Mäuse □ erhielten eine intratracheale Instillation von 50µg LPS. Die Anzahl der A)neutrophilen Granulozyten (PMN), B)Alveolarmakrophagen, C)Monozyten und D)Lymphozyten wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der broncheoalveolären Lavage bestimmt. n=4-10 +++, p< 0,001 vs. der anderen Mausgruppe desselben Zeitintervalls

### **3.1.5 Vergleich der alveolo-kapillären-Schrankenstörung in Wildtyp- und CCR2-defizienten-Mäusen nach 50µg LPS-Gabe**

Die Abbildung 9 zeigt die, wie unter Material und Methoden beschrieben, ermittelten Werte der alveolo-kapillären-Schrankenstörung vergleichend für beide Mausgruppen nach 50µg LPS Instillation. Unbehandelte Tiere beider Mausgruppen (0h Zeitpunkt) zeigten nur eine minimalen Übertritt von FITC-Albumin in das alveoläre Kompartiment (0,05). Nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS kam es bei beiden Mausgruppen zu einer Zunahme der Schrankenstörung mit Ansteigen der kapillo-alveolären FITC-Albumin Passage bis zum Höchstwert von 0,17 bei Wildtyp-Mäusen und 0,25 bei CCR2-defizienten-Mäusen nach 12h. Bis zum 120h Zeitpunkt erreichte die kapillo-alveoläre FITC-Albumin Passage wieder nahezu Ausgangswerte. Ab dem 3h Zeitpunkt fand sich bei CCR2-defizienten Mäusen konstant eine signifikant stärkere und länger anhaltende Schrankendysfunktion als in Wildtyp-Mäusen.

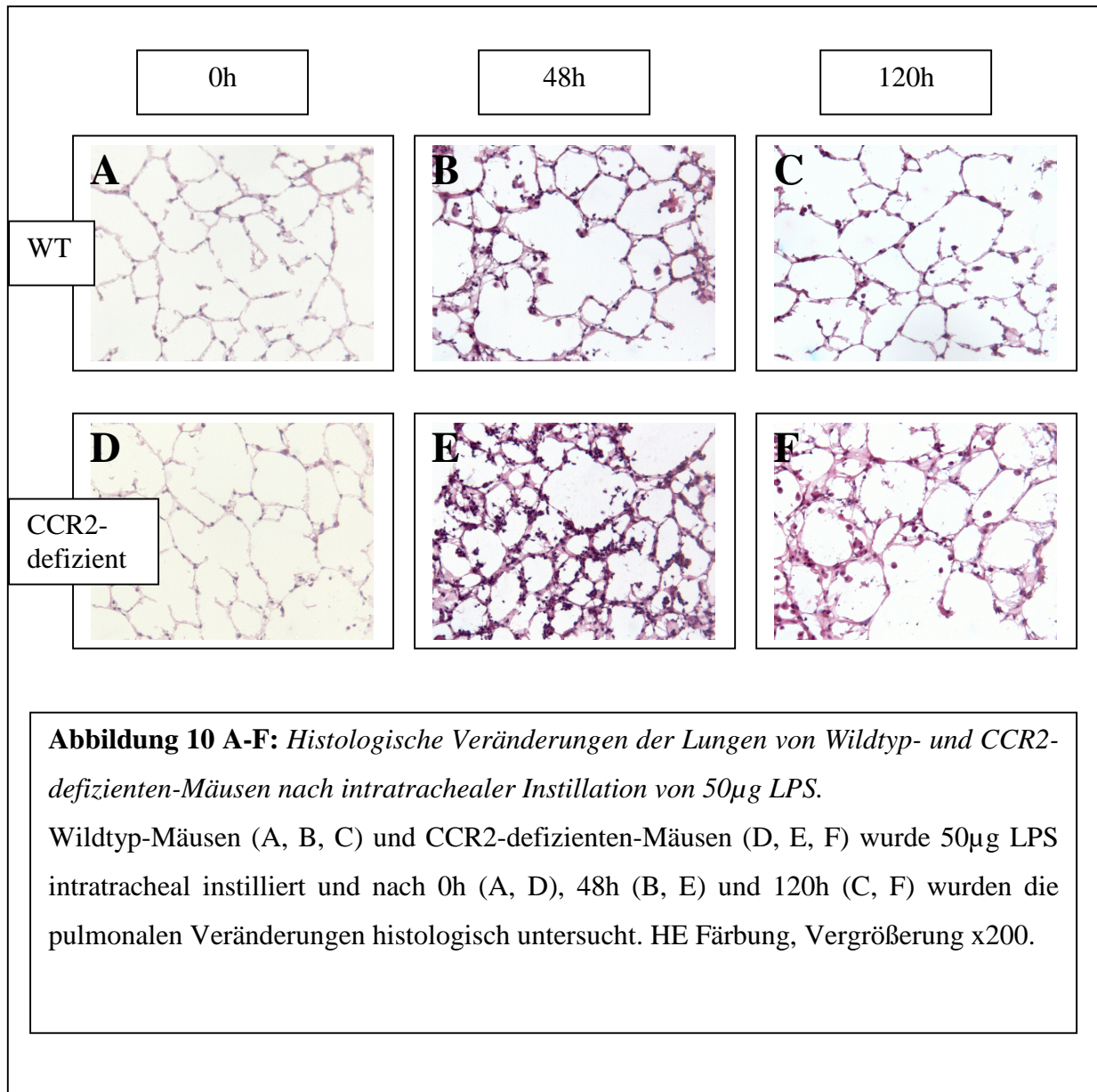


**Abbildung 9:** *Veränderungen der pulmonalen Schrankenfunktion nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS bei Wildtyp-Mäusen und CCR2-defizienten-Mäusen.* Wildtyp- ■ und CCR2-defiziente-Mäuse □ erhielten eine intratracheale Instillation von 50µg LPS. Der Grad der alveolo-kapillären Schrankenstörung wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten ermittelt. n=4-10  
+, p< 0,05 vs. den Wildtyp-Mäusen desselben Zeitintervalls

### **3.1.6 Vergleichende Lungen-Histologie mit 50µg LPS behandelter Wildtyp- und CCR2-defizienter Mäuse**

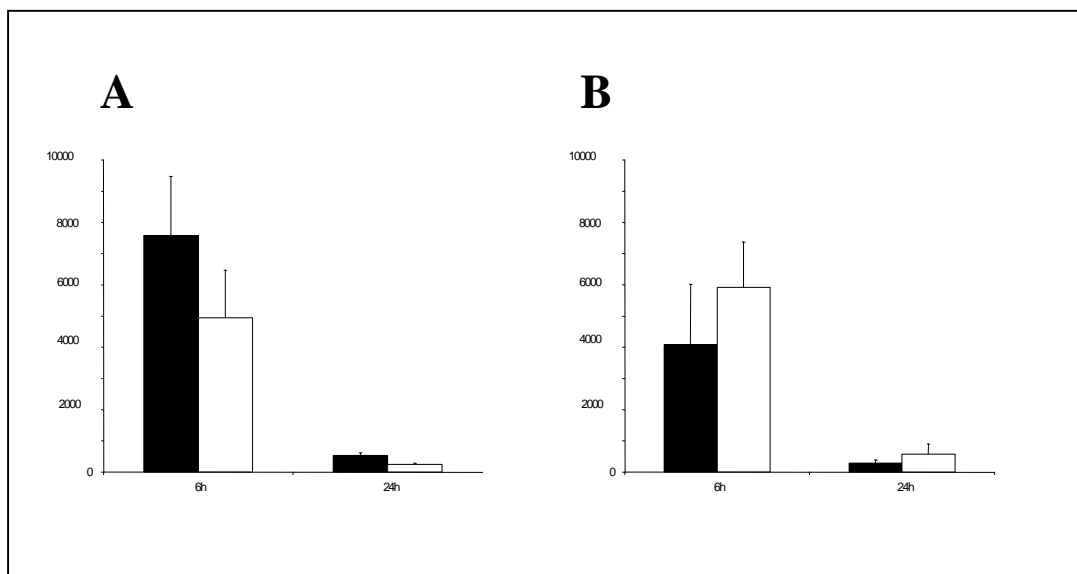
Zur weiteren Differenzierung der 50µg LPS-Wirkung auf das Lungengewebe der zwei verschiedenen Mausgruppen wurden Lungenschnitte histologisch verglichen. Bei unbehandelten Tieren (0h Zeitpunkt) fand sich in Wildtyp- (Abb. 10A) und CCR2-defizienten-Mäusen (Abb. 10D) ein reizloses und zellarmes Lungengewebe ohne auffällige Unterschiede. Sowohl den Wildtyp- als auch den CCR2-defizienten-Mäusen wurde 50µg LPS intratracheal verabreicht und zu den zwei Zeitpunkten 48h und 120h nach LPS-Gabe wurden, wie unter Material und Methoden unter 2.3 beschrieben, histologische Untersuchungen angeschlossen. Bei beiden Mausgruppen war 48h nach LPS-Gabe eine verstärkte entzündliche Infiltration des Lungengewebes zu beobachten. In der Gegenüberstellung der beiden Abbildungen 10B (Wildtyp-Maus 48h nach LPS-Gabe) und 10E (CCR2-defiziente-Maus 48h nach LPS-Gabe) zeigen sich aber deutlich stärkere inflammatorische Veränderungen im Lungengewebe der CCR2-defizienten-Mäuse mit Verdickung der Kapillarwände, stärkerer Durchblutung und ausgeprägterem Entzündungsinfiltrat.

In den Abbildungen 10C (Wildtyp-Maus 120h nach LPS-Gabe) und 10F (CCR2-defiziente-Maus 120h nach LPS-Gabe) findet sich ein Rückgang der pulmonalen Inflammation im Vergleich zum 48h Zeitpunkt. Diese Rückbildung der Inflammation war jedoch in CCR2-defizienten-Mäusen deutlich geringer ausgeprägt als in Wildtyp-Tieren. CCR2-defiziente-Mäuse zeigten somit eine stärker ausgeprägte und länger anhaltende Entzündungsreaktion nach LPS Gabe in der Lungenhistologie.



### 3.1.7 Vergleich der BALF Konzentrationen der Chemokine KC und MIP-2 von Wildtyp- und CCR2-defizienten Mäusen nach LPS Gabe

Um zu klären, ob eine verstärkte alveoläre Freisetzung Neutrophilen-chemotaktischer Mediatoren für die gesteigerte alveoläre Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in CCR2-defizienten Tieren verantwortlich ist, wurden in der BAL-Flüssigkeit von Wildtyp- und CCR2-defizienten-Mäusen nach einer intratrachealen Behandlung mit 50µg LPS die Konzentrationen der Chemokine KC (Abbildung 12A) und MIP-2 (Abbildung 11B) bestimmt. In beiden Mausgruppen fand sich 6h nach Behandlung mit LPS ein Anstieg der Chemokin-Spiegel, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und CCR2-defizienten Tieren. Somit scheint die verstärkte Neutrophilenrekrutierung in CCR2-defizienten Tieren nicht durch eine verstärkte Freisetzung der Chemokine KC und MIP-2 im Alveolarraum bedingt zu sein.



**Abbildung 11:** Expression neutrophile Granulozyten-rekrutierender Chemokine nach 50µg LPS-Instillation.

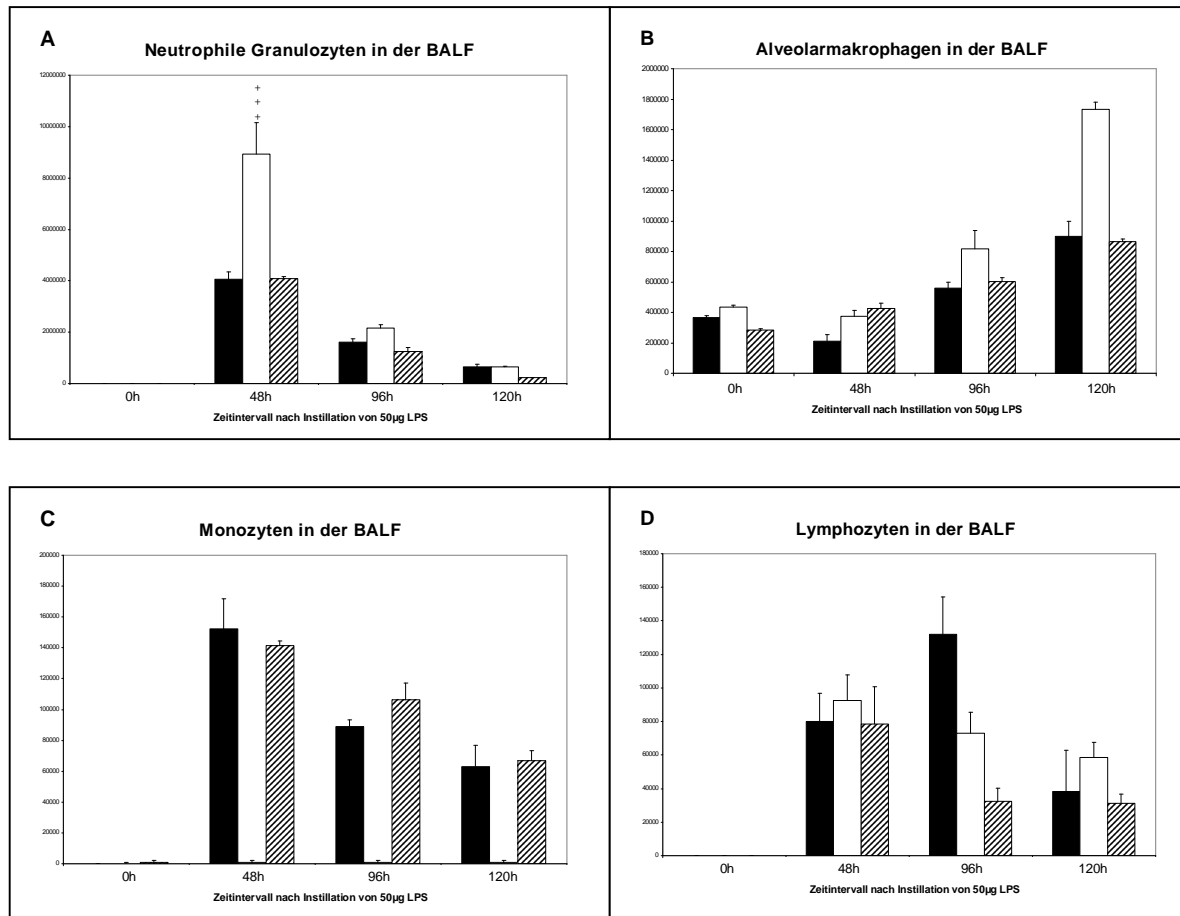
Wildtyp-Mäuse ■ und CCR2-defiziente Mäuse □ erhielten 50µg LPS intratracheal (n=5-7). Nach jeweils 6h und 24h erfolgte die Bestimmung der Chemokin-Expression von KC (A) und MIP-2 (B) in der BALF mittels ELISA.

### **3.2 Vergleich der BALF Zytologie nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS in Wildtyp-, Fraktalkine-Rezeptor defizienten (FR-KO) (CX3CR1<sup>GFP/GFP</sup>) und CCR2-defizienten-Mäusen**

Um zu klären, ob die in CCR-defizienten Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beobachtete Verstärkung der pulmonalen Inflammation auch in Fraktalkine-Rezeptor defizienten Tieren auftritt, wurde das Zellprofil nach LPS Gabe in der BAL von Wildtyp-, CCR2-defizienten und Fraktalkinerezeptor-defizienten Tieren verglichen. Die Zytozentrifugenpräparate der BAL wurden wie im Abschnitt Material und Methoden unter 2.4 beschrieben angefertigt und ausgewertet. Die Abbildungen 12 A-D zeigen die absoluten Zellzahlen für neutrophile Granulozyten, Alveolarmakrophagen, rekrutierte Exsudatsmakrophagen und Lymphozyten in der BALF von Wildtyp-, CCR2-defizienten- und Fraktalkine-Rezeptor defizienten Mäusen (CX3CR1<sup>GFP/GFP</sup>) nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS im Zeitverlauf. In der Abbildung 12A wird die Anzahl der neutrophilen Granulozyten (PMN) in der BALF für die 3 oben genannten Mausgruppen nach unterschiedlichen Zeitintervallen nach LPS-Instillation dargestellt. Bei unbehandelten Tieren (0h Zeitpunkt) aller 3 Mausgruppen fanden sich keine neutrophilen Granulozyten in der BALF. Sowohl bei Wildtyp-Mäusen als auch bei CCR2- und CX3CR1-defizienten Mäusen kam es nach LPS Gabe zu einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten in der BALF mit einem Maximum nach 48h. Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten 48h nach LPS-Instillation erreichte in Wildtyp-Tieren 4,1Mio, in CCR2-defizienten-Mäusen 9Mio und in Fraktalkine-Rezeptor defizienten Mäusen 4,1Mio. Im Gegensatz zu CCR2-defizienten Tieren mit deutlich erhöhter Neutrophilenrekrutierung war somit die Anzahl neutrophiler Granulozyten bei Fraktalkine-Rezeptor defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Tieren nicht gesteigert. Abbildung 12 B zeigt die Veränderungen der Anzahl der Alveolarmakrophagen zu verschiedenen Zeitpunkten nach LPS-Gabe vergleichend zwischen Wildtyp-, CCR2-defizienten- und Fraktalkine-Rezeptor defizienten Mäusen. Unbehandelt (0h-Zeitpunkt) zeigten alle 3 Mausgruppen eine vergleichbare Anzahl Alveolarmakrophagen (WT-> 0,37Mio, CCR2-KO-> 0,44Mio, Fraktalkine-Rezeptor defiziente Mäuse-> 0,28Mio) in der BALF. Auch nach LPS-Gabe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Alveolarmakrophagen zu den gewählten Zeitpunkten zwischen den untersuchten Mausgruppen.



Die Untersuchung auf Unterschiede in der Anzahl rekrutierter Exsudatmakrophagen nach 50µg LPS-Gabe zwischen den Mausgruppen ist in Abbildung 12 C dargestellt. In unbehandelten Tieren (0h-Wert) lassen sich in allen Mausgruppen keine Exsudatmakrophagen in der BALF nachweisen. Nach LPS-Gabe fehlte der Anstieg von Exsudatmakrophagen in der BALF wie bereits unter 3.2.1 beschrieben in CCR2-defizienten-Mäusen. Demgegenüber zeigten sowohl Wildtyp-Mäuse als auch Fraktalkine-Rezeptor defiziente Mäuse einen Anstieg der Exsudatmakrophagen in der BALF mit einem Maximum nach 48h (Wildtyp-Mäuse-> 0,15Mio und Fraktalkine-Rezeptor defiziente Mäuse-> 0,14Mio). Der zeitliche alveoläre Rekrutierungsverlauf von Exsudatmakrophagen in Fraktalkine-Rezeptor defizienten Mäusen entsprach somit dem von Wildtyp-Mäusen. In Abbildung 12 D sind die Veränderungen der Anzahl von Lymphozyten nach Instillation von 50µg LPS bei Wildtyp-Mäusen, CCR2-defizienten-Mäusen und Fraktalkine- Rezeptor defizienten Mäusen dargestellt. Bei unbehandelten Tieren (0h Zeitpunkt) fanden sich in allen 3 Mausgruppen keine Lymphozyten in der BAL-Flüssigkeit. Die Lymphozytenrekrutierungskinetik in das alveoläre Kompartiment nach LPS-Gabe zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Mausgruppen. Zusammenfassend zeigten Fraktalkine-Rezeptor defiziente Mäuse demnach im Gegensatz zu CCR2-defizienten Tieren die gleiche Rekrutierungskinetik inflammatorischer Zellen in die BALF wie Wildtyp-Tiere.



**Abbildung 12 A-D:** Rekrutierung unterschiedlicher Leukozytenpopulationen nach intratrachealer Instillation von 50µg in Wildtyp-Mäusen, CCR2-defizienten-Mäusen und Fraktalkine-Rezeptor defizienten Mäusen ( $CX3CR1^{GFP/GFP}$ ).

Wildtyp-Mäuse ■, CCR2-defiziente-Mäuse □ und Fraktalkine-Rezeptor defiziente Mäuse ▨ erhielten eine intratracheale Instillation von 50µg LPS (n=4-12). Die Anzahl der A)neutrophilen Granulozyten (PMN) B)Alveolarmakrophagen C)Monozyten und D)Lymphozyten wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der broncheoalveolären Lavage ermittelt.

+++,  $p < 0,001$  vs. der anderen Mausgruppen desselben Zeitintervalls

### 3.3 Das chimäre Mausmodell

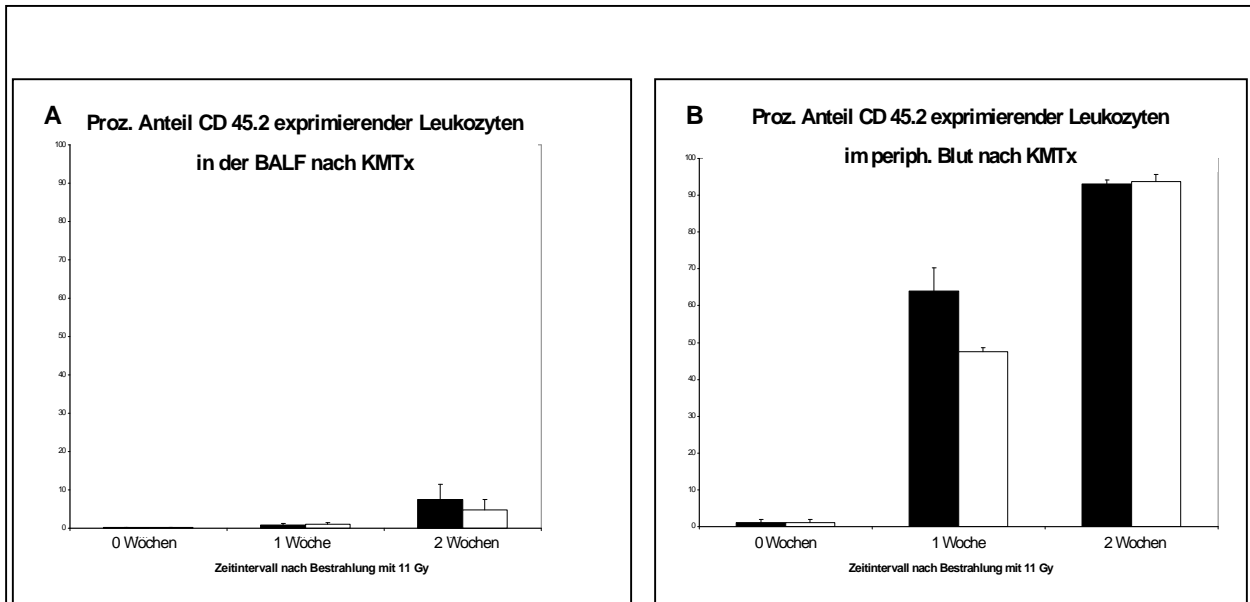
Beim chimären Mausmodell erfolgte wie unter 2.1.5.6 beschrieben eine Knochenmarkstransplantation auf CD 45.1 Mäuse. Diese Empfängeräuse wurden mit 11 Gy bestrahlt und erhielten anschließend eine Knochenmarkstransplantation von CD45.2 Spendertieren. Empfängeräuse, die aufbereitete Knochenmarkszellen von Wildtyp-Mäusen (CD 45.2) erhielten, werden im Folgenden mit WT-KM, Empfängeräuse, die aufbereitete Knochenmarkszellen von CCR2-defizienten-Mäusen erhielten, mit CCR2-KO-KM abgekürzt.

#### 3.3.1 Transplantations-Effizienz

Zur Untersuchung der Effizienz der Knochenmarkstransplantation wurde der prozentuale Anteil CD 45.2 positiver Zellen in der brocheoalveolären Lavage und im peripheren Blut von mit Wildtyp-Knochenmark und CCR2-defizientem-Knochenmark transplantierten CD 45.1 Wildtyp-Mäuse nach 0, 1 und 2 Wochen untersucht (Abb. 13). Die Abbildung 13A zeigt den prozentualen Anteil CD45.2 positiver Zellen in der brocheoalveolären Lavage. Direkt nach Transplantation (0 Wochenzeitpunkt) fanden sich in den brocheoalveolären Lavagen der mit Wildtyp-Knochenmark und CCR2-defizientem-Knochenmark transplantierten CD 45.1 positiven Empfängeräuse keine CD 45.1 positiven Zellen. Im Verlauf der ersten und zweiten Woche kommt es zu einem geringen Anstieg des prozentualen Anteiles an CD 45.2 positiver Zellen in der BALF. Nach 2 Wochen beträgt der prozentuale Anteil an CD 45.2 positiven Zellen in der brocheoalveolären Lavage bei den mit Wildtyp-Knochenmark transplantierten Mäusen 7,5% und bei den mit CCR2-defizientem-Knochenmark transplantierten Tieren 4,8%.

In der Abbildung 13B ist der prozentuale Anteil CD45.2 positiver Zellen im peripheren Blut von CD 45.1 Empfänger-Mäusen nach Transplantation von Wildtyp-Knochenmark und CCR2-defizientem-Knochenmark dargestellt. Zum 0 Wochenzeitpunkt ließen sich in beiden Mausgruppen kaum CD45.2 positive Zellen im peripheren Blut nachweisen. Im Verlauf der ersten und zweiten Woche nach Knochenmarkstransplantation fand sich ein rascher Anstieg von CD45.2 positiver Spenderzellen im peripheren Blut bei beiden Mausgruppen. In der zweiten Woche erreichte der prozentuale Anteil CD 45.2 positiver

Spenderzellen bei den mit Wildtyp-Knochenmark transplantierten Mäusen 93% und bei den mit CCR2-defizientem-Knochenmark transplantierten Tieren 93,6%. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausgruppen.



**Abbildung 13:** Anteil der Spenderleukozyten 0, 1 und 2 Wochen nach Knochenmarkstransplantation in der bronchoalveolären Lavage und im peripheren Blut der Empfängertiere. CD 45.1 exprimierende Wildtyp-Mäuse (Empfängermäuse) wurden letal bestrahlt und mit Knochenmark von CD 45.2 exprimierenden Wildtyp-Spendermäusen ■ (WT-KM) oder CCR2-defizienten Spendermäusen □ (CCR2-KM) transplantiert (n=5). Der Anteil CD 45.2 exprimierender Spenderzellen wurde nach 0, 1 und 2 Wochen nach Transplantation durchflusszytometrisch in der A) bronchoalveolären Lavage und B) im peripheren Blut bestimmt.

### **3.3.2 Alveoläre Leukozytenrekrutierung in chimären Mäusen nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS verglichen mit Wildtyp- und CCR2-defizienten-Mäusen**

Um zu klären, ob die CCR2 Expression auf Lungen-residenten oder auf aus der Zirkulation rekrutierten Immunzellen für das veränderte pulmonale Entzündungsprofil nach LPS-Gabe in CCR2 defizienten Tieren verantwortlich war, wurden Experimente im Chimärenmodell durchgeführt. Die Abbildungen 14A-D zeigen vergleichend Untersuchungen zur Differentialzytologie der BALF. Verglichen wurden mit 50µg LPS intratracheal instillierte Wildtyp-, CCR2-defiziente- und chimäre Mäuse, die wie unter 2.1.5.6 beschrieben mit Wildtyp-Knochenmark (WT-KM) oder CCR2-defizientem Knochenmark (CCR2-KO-KM) behandelt worden waren.

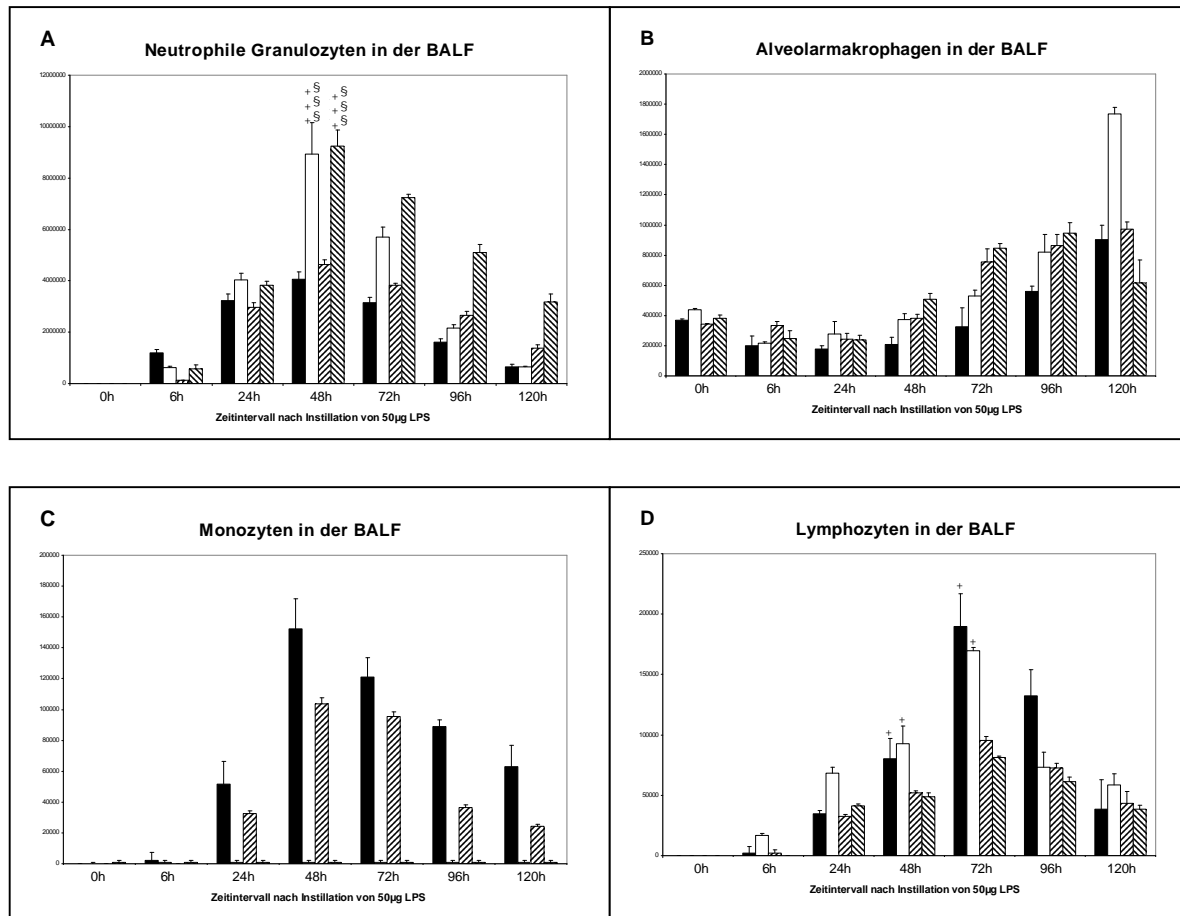
Abbildung 14A zeigt die Gegenüberstellung der Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der BALF nach Instillation von LPS bei allen vier Mausgruppen. Zum 0h Zeitpunkt fanden sich in allen vier Mausgruppen keine neutrophilen Granulozyten in der broncheoalveolären Lavage. Nach 48h wurde in allen Mausgruppen die maximale Anzahl neutrophiler Granulozyten in der BALF erreicht. Es fanden sich jedoch signifikante Unterschiede im Ausmaß der Neutrophilen-Rekrutierung zwischen den einzelnen Mausgruppen. Zum 48h-Zeitpunkt wiesen Wildtyp-Mäuse -> 4,1Mio, CCR2-defiziente-Mäuse -> 9Mio, chimäre Mäuse mit Wildtyp-Knochenmark -> 4,6Mio und mit CCR2-defizientem-Knochenmark -> 9,2Mio neutrophile Granulozyten im Mittel in der Lavage auf. Auch im weiteren Verlauf entsprach die Rekrutierungskinetik der neutrophilen Granulozyten der chimären Mäuse mit Wildtyp-Knochenmark der von Wildtyptieren. Demgegenüber zeigten Tiere, denen CCR2-defizientes Knochenmark transplantiert wurde, wie CCR2-defiziente Mäuse eine verstärkte und prolongierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das alveoläre Kompartiment.

In Abbildung 14B sind die zeitlichen Veränderungen in der Anzahl der Alveolarmakrophagen vergleichend zwischen den 4 Mausgruppen (Wildtyp-Mäusen, CCR2-defizienten-Mäusen und chimären Mäusen) dargestellt. Unbehandelte Tiere aller Mausgruppen zeigten ähnliche Ausgangswerte in der Anzahl an Alveolarmakrophagen in der broncheoalveolären Lavage (Wildtyp-Mäuse-> 0,37Mio, CCR2-defiziente-Mäuse-> 0,44Mio, WT-KM-> 0,24Mio und CCR2-KO-KM-> 0,38Mio im Mittel). Nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS erfolgte in allen Mausgruppen zunächst eine leichte Abnahme der Zellzahlen von Alveolarmakrophagen in der BALF. Danach

stiegen die Zellzahlen der Alveolarmakrophagen in der Lavage in allen Mausgruppen in vergleichbarem Ausmaß an.

Die Anzahl rekrutierter Exsudatmakrophagen der verschiedenen Mausgruppen nach 50µg LPS-Gabe ist in Abbildung 14C dargestellt. Bei unbehandelten Tieren (0h-Wert) aller Mausgruppen ließen sich keine Exsudatmakrophagen in der BAL-Flüssigkeit nachweisen. Nach LPS-Gabe kam es zu einem Anstieg der BALF Exsudatmakrophagen in Wildtyp-Mäusen und in chimären Mäusen mit Wildtyp-Knochenmark mit einem Maximum nach 48h bei Wildtyp-Mäusen von 0,15 Mio. und bei chimären Mäusen mit Wildtyp-Knochenmark von 0,1 Mio.. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen und den chimären Mäusen mit Wildtyp-Knochenmark kam es bei den CCR2-defizienten-Mäusen und den chimären Mäusen mit CCR2-defizientem-Knochenmark zu keiner signifikanten Änderung der Exsudatmakrophagen-Anzahl nach LPS-Gabe. Sowohl in CCR2-defizienten Mäusen als auch in chimären Mäusen mit CCR2-defizientem-Knochenmark fehlt somit die in Wildtyp-Tieren nach intratrachealer LPS Instillation regelhaft nachweisbare alveoläre Rekrutierung von Exsudatmakrophagen. Demnach ist die fehlende Expression auf zirkulierenden und nicht auf Lungen-residenten Entzündungszellen für den Rekrutierungsdefekt in CCR2 defizienten Tieren verantwortlich.

In Abbildung 14D sind die Veränderungen der Anzahl von BALF Lymphozyten nach Instillation von 50µg LPS dargestellt. Die vier untersuchten Mausgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der alveolären Rekrutierungskinetik von Lymphozyten. Die maximale Lymphozytenanzahl in der bronchoalveolären Lavage wird bei allen vier Mausgruppen 72h nach LPS-Gabe mit im Mittel 0,19Mio in Wildtyp-Mäusen, 0,17Mio in CCR2-defizienten-Mäusen, 0,1Mio in chimären Mäusen mit Wildtyp-Knochenmark und 0,1Mio in chimären Mäusen mit CCR2-defizientem-Knochenmark erreicht. Danach kam es bei allen vier Mausgruppen zu einer Abnahme der Lymphozyten Zellzahlen in der BAL-Flüssigkeit. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden chimären Mausgruppen sowie zwischen Wildtyp- und CCR2-defizienten-Mäusen. Allerdings zeigten nach 48 und 72h die chimären Mäuse signifikant niedrigere Lymphozyten Zellzahlen in der BALF als die nicht transplantierten Wildtyp- und CCR2-defizienten Tiere.



**Abbildung 14 A-D:** Gegenüberstellung der Rekrutierung unterschiedlicher Leukozytenpopulationen nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS in Wildtyp-Mäusen, CCR2-defizienten-Mäusen, mit Wildtyp-Knochenmark transplantierten chimären Mäusen (WT-KM) und mit CCR2-defizientem Knochenmark transplantierten chimären Mäusen (CCR2-KO-KM).

Wildtyp-Mäuse ■ , CCR2-defiziente Mäuse □ , chimäre Mäuse mit Wildtyp-Knochenmark ▨ oder chimäre Mäuse mit CCR2-defizientem Knochenmark ▩ erhielten eine intratracheale Instillation von 50µg LPS (n=4-12). Die Anzahl der A)neutrophilen Granulozyten (PMN) B)Alveolarmakrophagen C)Monozyten und D)Lymphozyten wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels broncheoalveolärer Lavage ermittelt.

+++ , p< 0,001 vs. Wildtyp-Mäuse desselben Zeitintervalls;

§§§ , p< 0,001 vs. chimäre Mäuse mit Wildtyp-Knochenmark desselben Zeitintervalls;

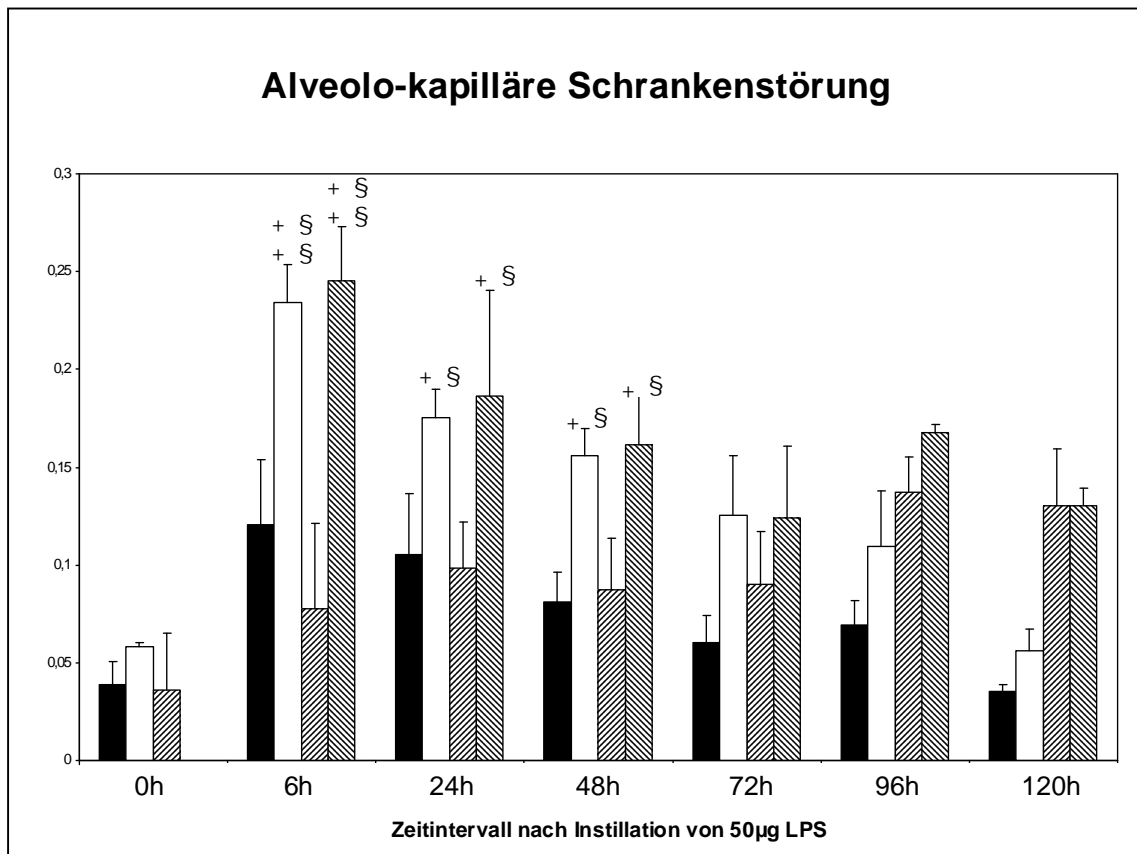
\*, p< 0,05 vs. chimäre Mausgruppen desselben Zeitintervalls

### **3.3.3 Vergleich der alveolo-kapillären-Schrankenstörung nach 50µg LPS-Gabe in Wildtyp-, CCR2-defizienten- und chimären Mäusen, die mit Wildtyp- oder CCR2-defizientem-Knochenmark transplantiert wurden**

In Abb. 15 sind die Werte der alveolo-kapillären-Schrankenstörung der 4 Mausgruppen nach 50µg LPS Instillation gegenübergestellt. Nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS kommt es bei allen Versuchs-Gruppen zu einer verstärkten Schrankenstörung mit Ansteigen der kapillo-alveolären FITC Albumin Passage bis zum Maximum 6h nach LPS Instillation. Dieser Höchstwert beträgt im Mittel bei Wildtyp-Mäusen 0,12, bei CCR2-defizienten-Mäusen 0,23, bei den chimären Mäusen mit Wildyp-Knochenmark 0,12 und bei chimären Tieren mit CCR2-defizientem Knochenmark 0,25.

Es bestätigt sich somit die bereits unter 3.3.2 beschriebene signifikant höhere Schrankenstörungen bei den CCR2-defizienten Mäusen im Vergleich mit den Wildtyp-Mäusen. Darüber hinaus zeigt der Vergleich der chimären Versuchsgruppen eine signifikant stärkere Schrankenstörung bei chimären Mäusen mit CCR2-defizientem Knochenmark als bei chimären Tieren, die mit Wildtyp-Knochenmark transplantiert wurden. Demnach ist auch die verstärkte Schrankenstörung in CCR2 defizienten Tieren mit der fehlenden Expression von CCR2 auf zirkulierenden Entzündungszellen assoziiert.





**Abbildung 15:** Veränderungen der alveolo-kapillären-Schrankenstörung nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS bei Wildtyp-Mäusen, CCR2-defizienten-Mäusen, chimären Mäusen mit Transplantation von Wildtyp-Knochenmark und mit Transplantation von CCR2-defizientem-Knochenmark.

Wildtyp-Mäuse ■ , CCR2-defiziente Mäuse □ , chimäre Mäuse mit Wildtyp-Knochenmark ▨ oder chimäre Mäuse mit CCR2-defizientem Knochenmark ▩ erhielten eine intratracheale Instillation von 50µg LPS (n=4-12). Der Grad der alveolo-kapillären Schrankenstörung wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten ermittelt.

++ und +, p < 0,01 und p < 0,05 vs. Wildtyp-Mäuse desselben Zeitintervalls;

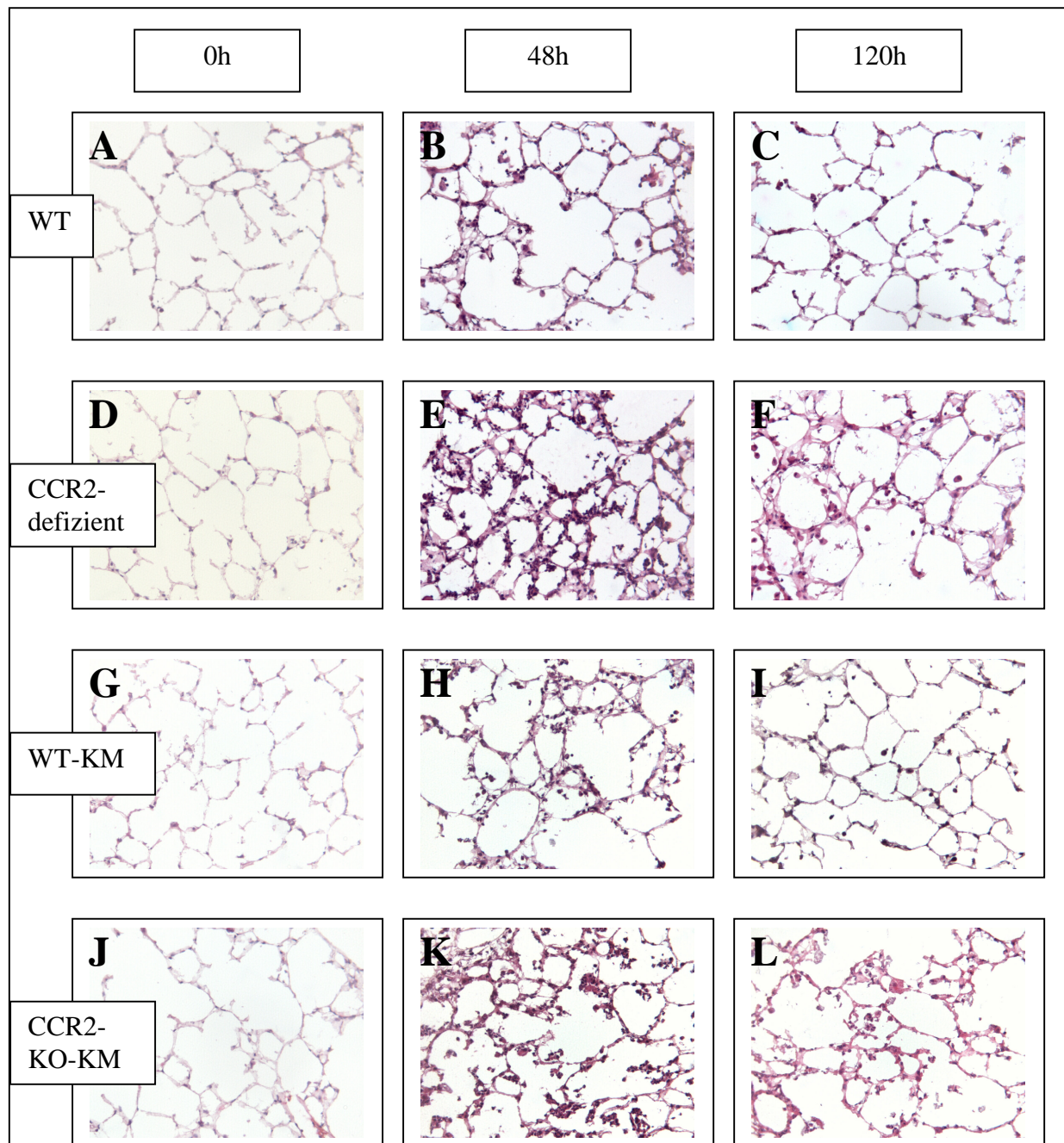
§§ und §, p < 0,01 und p < 0,05 vs. chimäre Mäuse mit Wildtyp-Knochenmark desselben Zeitintervalls

### **3.3.4 Histologie des Lungengewebes von Wildtyp-, CCR2-defizienten sowie chimären Mäusen transplantiert mit Wildtyp- oder CCR2-defizientem Knochenmark nach LPS-Instillation**

Von Lungen der mit 50µg LPS intratracheal behandelten vier Mausgruppen (Wildtyp-, CCR2-defiziente und chimäre Mäuse transplantiert mit Wildtyp-Knochenmark oder CCR2-defizientem Knochenmark) wurden histologische Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Unbehandelt (Zeitpunkt 0h) zeigten alle vier Mausgruppen ein reizloses Lungengewebe ohne auffällige Unterschiede.

Zum Zeitpunkt 48h nach intratrachealer LPS Instillation fand sich in allen vier Mausgruppen eine deutliche pulmonale Inflammation mit Infiltration des Lungenparenchyms durch Entzündungszellen. Die histologischen Präparate der vier Mausgruppen zum 48h Zeitpunkt sind in den Abbildungen 16 B (Wildtyp-Mäuse), 16 E (CCR2-defiziente Mäuse), 16 H (chimäre Mäuse mit Wildtyp-Knochenmark) und 16 K (chimäre Mäuse mit CCR2-defizientem Knochenmark) gegenübergestellt. Zwischen den Gruppen fallen starke Unterschiede auf. Wie bereits unter 3.3.3 dargestellt, zeigten CCR2-defiziente Mäuse eine deutlich stärkere inflammatorische Reaktion im Lungengewebe als Wildtyp Tiere. Die beiden Histologien der chimären Mäuse wiesen ebenfalls starke Unterschiede auf. Das Lungengewebe der chimären Mäuse mit CCR2-defizientem-Knochenmark zeigt eine deutlich stärkere Entzündungsreaktion mit Verdickung der Kapillarwände, stärkerer Durchblutung und Entzündungszell-Infiltration als die Tiere, denen Wildtyp Knochenmark transplantiert wurde. Zum Zeitpunkt 120h nach intratrachealer LPS Instillation (Abbildungen 16 C (Wildtyp-Maus 120h nach LPS-Gabe), 16 F (CCR2-defiziente Maus 120h nach LPS-Gabe), 16 I (chimäre Mäuse mit Wildtyp-Knochenmark 120h nach LPS-Gabe) und 16 L (chimäre Mäuse mit CCR2-defizientem-Knochenmark 120h nach LPS-Gabe)) fand sich in allen Gruppen ein Rückgang der Entzündungsreaktion im Vergleich zum 48h Zeitpunkt. Wie bereits unter 3.3.3 dargestellt, zeigten die CCR2-defizienten-Mäuse (16 F) aber auch zum 120h Zeitpunkt eine stärkere Entzündung in der Histologie als Wildtyp-Mäuse (16 C). Auch bei den chimären Mäusen fanden sich Unterschiede im Inflamationsgrad. Die chimären Mäuse, die mit CCR2-defizientem-Knochenmark transplantiert wurden, zeigten auch nach 120h eine stärkere inflammatorische Reaktion als chimäre Mäuse, die mit Wildtyp-Knochenmark transplantiert wurden. Insgesamt zeigte die histologische Untersuchung des Lungengewebes eine stärkere und länger anhaltende Entzündungsreaktion bei CCR2-defizienten Mäusen und chimären Mäusen, die mit

CCR2-defizientem Knochenmark transplantiert wurden. Bei diesen Tieren ist wegen der fehlenden Expression von CCR2 auf zirkulierenden Monozyten die Entzündungsgetriebene Rekrutierung von Exsudatmakrophagen in die Lunge stark reduziert. Dies stützt die Hypothese, dass die in Wildtyp und in chimären Tieren, die mit Wildtyp Knochenmark transplantiert wurden, CCR2-abhängig pulmonal rekrutierten Exsudatmakrophagen Intensität und Dauer der pulmonalen Inflammation nach LPS Gabe attenuieren.



**Abbildung 16 A-L:** Histologische Veränderungen der Lungen von Wildtyp-Mäusen, CCR2-defizienten-Mäusen, chimären Mäusen mit Wildtyp-Knochenmark oder CCR2-defizientem-Knochenmark nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS.

Wildtyp-Mäusen (WT: A, B, C), CCR2-defizienten-Mäusen (CCR2-KO: D, E, F), chimären Mäusen mit Wildtyp-Knochenmark (WT-KM: G, H, I) oder chimären Mäusen mit CCR2-defizientem Knochenmark (CCR2-KO-KM: J, K, L) wurden 50µg LPS intratracheal instilliert und nach 0h (A, D, G, J), 48h (B, E, H, K) und 120h (C, F, I, L) die pulmonalen Veränderungen histologisch untersucht. HE Färbung, Vergrößerung x200.

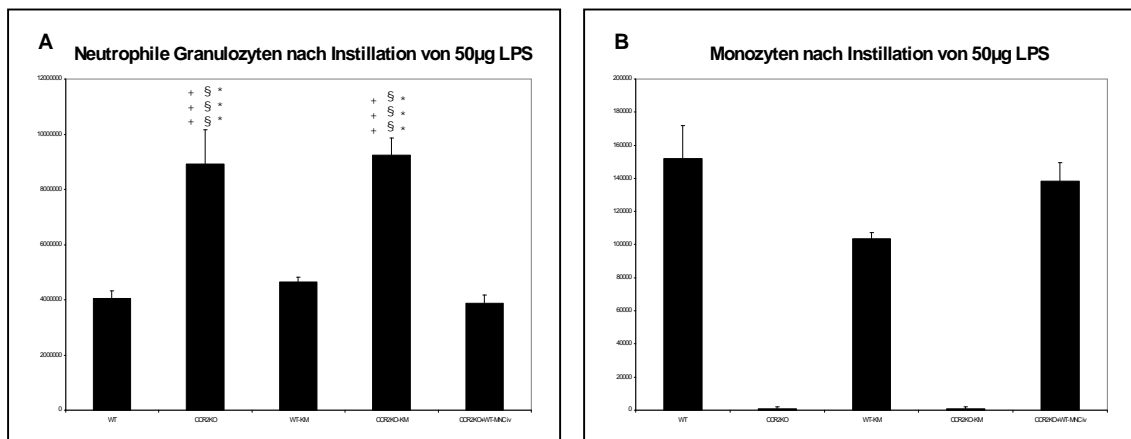
### 3.4 Adoptiver Transfer mononukleärer Zellen

Um zu untersuchen, ob intravenös transferierte mononukleäre Blutzellen mit intakter CCR2-Expression die verstärkte pulmonale Entzündungsreaktion CCR2-defizienter Tiere abschwächen können, wurde der Anteil der neutrophilen Granulozyten (Abb. 17A) und Monozyten (Abb. 17B) in BAL Zytozentrifugenpräparaten 48h nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS nach intravenöser Gabe von Monozyten mit intakter und fehlender CCR2-Expression vergleichend analysiert. Die in diesen Versuchsgruppen gegenübergestellten Mäuse sind Wildtyp-Mäuse, CCR2-defiziente Mäuse, chimäre Mäuse mit Wildtyp-Knochenmark oder mit CCR2-defizientem-Knochenmark und CCR2-defiziente Mäuse mit intravenösem Transfer mononukleärer Zellen von Wildtyp-Mäusen.

CCR2-defiziente Mäuse und chimäre Mäuse, die mit CCR2-defizientem-Knochenmark transplantiert wurden, zeigten einen deutlich höheren Anteil neutrophiler Granulozyten in der BALF als Wildtyp Tiere und chimäre Mäuse, die mit Wildtyp-Knochenmark transplantiert wurden. In CCR2-defizienten Mäusen, denen mononukleäre Blutzellen von Wildtyp-Mäusen transferiert wurden, war der Anteil der neutrophilen Granulozyten in der BALF vergleichbar mit Wildtyp-Mäusen und signifikant niedriger als in CCR2-defizienten Mäusen ohne adoptiven Zelltransfer.

Die Analyse der Anzahl rekrutierter Monozyten 48h nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS zeigte, dass CCR2-defiziente Mäuse nach intravenösem Transfer von mononukleären Zellen von Wildtyp-Mäusen einen signifikant höheren Anteil von BAL Exsudatmakrophagen aufwiesen als CCR2-defiziente Mäuse und chimäre Mäuse nach Transplantation mit CCR2-defizientem-Knochenmark (Abbildung 17B).

Die Befunde zeigen, dass der adoptive Transfer von mononukleären Blutzellen von Wildtyp Tieren in CCR2-defiziente Mäuse die Rekrutierung von Exsudatmakrophagen nach LPS Gabe nahezu auf das Niveau von Wildtyp Tieren steigert. Interessanterweise revertiert dies auch die gesteigerte Neutrophilen Rekrutierung in CCR2-defizienten Tieren und deutet auf eine Entzündungs-regulierende Funktion CCR2-abhängig rekrutierter Exsudatmakrophagen hin.



**Abbildung 17:** *CCR2-exprimierende Blutleukozyten reduzieren die Migration neutrophiler Granulozyten bei erhaltener Monozytenrekrutierung.*

Wildtyp-Mäuse (WT), CCR2-defiziente Mäuse (CCR2-KO), chimäre Mäuse mit Transplantation von Wildtyp-Knochenmark (WT-KM), chimäre Mäuse mit Transplantation von CCR2-defizientem Knochenmark (CCR2-KO-KM) und CCR2-defiziente Mäuse mit i.v. Transfer mononukleärer Blutzellen von Wildtyp-Mäusen (CCR2-KO + WT-MNC iv) erhielten eine intratracheale Instillation von 50µg LPS (n=4-12). Die Anzahl der A)neutrophilen Granulozyten (PMN) und B) Monozyten wurde 48h nach Instillation mittels broncheoalveolärer Lavage ermittelt.

+++<sub>1</sub>, p< 0,001 vs. Wildtyp-Mäuse;

§§§<sub>1</sub>, p< 0,001 vs. chimäre Mäuse mit Wildtyp-Knochenmark;

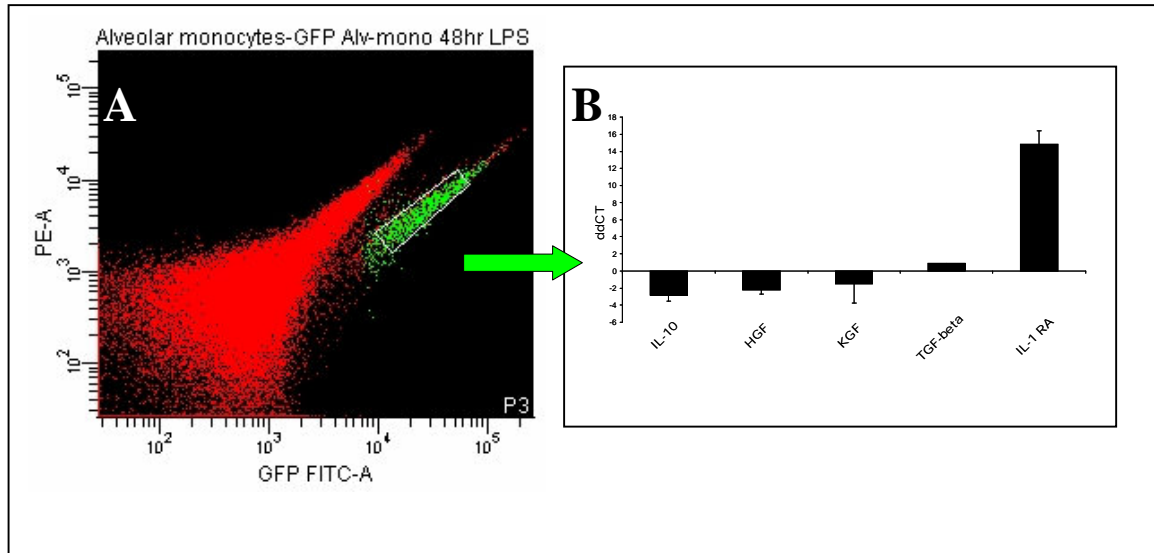
\*\*\*<sub>1</sub>, p< 0,001 vs. CCR2-defiziente Mäuse mit mononukleärem Zelltransfer

### **3.5 Zytokingenexpression in FACS-separierten BAL Exsudatmakrophagen und zirkulierenden Monozyten von CX3CR<sup>+/GFP</sup> Mäusen nach intratrachealer LPS- Instillation**

Um Zytokine zu identifizieren, die potentiell den Entzündungs-dämpfenden Effekt von Exsudatmakrophagen im LPS-Modell vermitteln können, wurde die Zytokingenexpression von BALF Exsudatmakrophagen und zirkulierenden Monozyten verglichen. Hierzu wurden CX3CR<sup>+/GFP</sup> Mäuse genutzt, in denen zirkulierende Monozyten und BALF Exsudatmakrophagen durch das Fraktalkin-Rezeptor-abhängig exprimierte GFP-Transgen endogen markiert sind und deshalb mit hoher Reinheit im FACS separiert werden können. Nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS in CX3CR<sup>+/GFP</sup> Mäuse erfolgte nach einem Zeitintervall von 48h eine Blutentnahme sowie eine bronchoalveoläre Lavage mit entsprechender Aufarbeitung wie unter Material und Methoden im Abschnitt 2.5 beschrieben.

Die Zellen der BALF und des peripheren Blutes wurden mit Hilfe eines Zellsorters in Subpopulationen separiert. In Abbildung 18A ist die Grün- (FITC, Absisse) und Rotfluoreszenz (PE, Ordinate) der BALF Zellen logarithmisch dargestellt. Exsudatmakrophagen lassen sich auf Grund des GFP-Transgens unter Kontrolle des Fraktalkine Rezeptors als grün fluoreszierende Zellpopulation abgrenzen. Die GFP-markierten Exsudatmakrophagen wurden mit hoher Reinheit durchflusszytometrisch sortiert und zur Genexpressionsanalyse mittels real time PCR aufgearbeitet.

Abbildung 18B zeigt die real time PCR Analyse der m-RNA-Expression der Zytokine IL-10, HGF, KGF, TGF-beta und IL-1 RA aus sortierten GFP markierten Exsudatmakrophagen im Vergleich zu FACS-separierten Monozyten aus dem peripheren Blut. Die Differenz der Genexpression in Exsudatmakrophagen im Vergleich zu zirkulierenden Monozyten ist auf der Ordinate dargestellt (DeltaDeltaCT=ddCT). In den Exsudatmakrophagen der BAL war die Genexpression der Zytokine TGF-beta und insbesondere IL-1 RA im Vergleich zu den Monozyten des peripheren Blutes deutlich erhöht. Die GFP-markierten Monozyten aus dem peripheren Blut exprimieren demgegenüber verstärkt die Zytokine IL-10, HGF und KGF. Die drastische Hochregulation von anti-inflammatorischem IL-1 RA in Exsudatmakrophagen der BALF ist ein Hinweis auf die funktionelle Relevanz dieses Zytokinrezeptorantagonisten im Kontext der akuten pulmonalen Inflammation.



**Abbildung 18:** *Alveolar rekrutierte CCR2-exprimierende Exsudatmakrophagen exprimieren verstärkt IL1-RA.*

(A) Durchflusszytometrische Identifikation und FACS Separation von CX3CR1-GFP-exprimierenden Exsudatmakrophagen (grün-fluoreszierend) in der broncheoalveolären Lavage von Fraktalkine-GFP-Mäusen CX3CR1<sup>+/GFP</sup> 48h nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS.

(B) Vergleichende real time RT-PCR Analyse der m-RNA-Expression ausgewählter Zytokine in mittels FACS isolierten Zellen (alveolär rekrutierte CCR2-exprimierende Exsudatmakrophagen vs. periphere CCR2 exprimierende Blut-Monozyten)



## 4 Diskussion

Eine akute pulmonale Inflammation des distalen Respirationstraktes kann durch verschiedene Ursachen hervorgerufen werden, am häufigsten tritt sie im Rahmen einer Pneumonie auf (5, 84, 85). Seit Jahrzehnten wird an der Pathogenese der Gasaustauschstörung im Rahmen 'Acute Respiratory Distress Syndroms' (ARDS) geforscht und nach neuen Therapiemöglichkeiten gesucht. Dennoch konnte bislang keine wirksame pharmakologische Therapie des ARDS etabliert werden, weshalb das akute Lungenversagen auch noch heute eine hohe Morbidität und Mortalität aufweist (85-87). In der vorliegenden Arbeit wurde durch intratracheale Instillation von LPS eine pulmonale Inflammation im Mausmodell induziert und die Rolle CCR2-abhängig alveolär rekrutierter mononukleärer Phagozyten in diesem Kontext untersucht (5).

### 4.1 Das Maus-Modell der Endotoxin-induzierten alveolären Inflammation

Es existieren mehrere Mausmodelle zur Induktion einer akuten pulmonalen Inflammation ('acute lung injury', ALI). Diese unterscheiden sich hinsichtlich des applizierten Entzündungstimulus (Erreger bzw. ihre Komponenten, Pharmaka wie Bleomycin) sowie der Verabreichungsart (88-91). Das gemeinsame Ziel aller ALI-Mausmodelle ist es eine der humanen pulmonalen Inflammation ähnelnde Situation im Tiermodell, z.B. in Mäusen zu reproduzieren (92,93). Beim Menschen sind die Pneumonie und die Sepsis die zwei häufigsten Auslöser einer pulmonalen Inflammation bzw. eines ARDS (85). Die pulmonale Inflammation nach LPS-Gabe ist durch die Rekrutierung inflammatorischer Zellen in die Lunge mit früher Neutrophilen- und verzögerter Monozytenakkumulation im Alveolarraum charakterisiert (49). Parallel konnte eine gesteigerte endoepitheliale Permeabilitätserhöhung mit korrespondierendem Proteinübertritt aus dem Gefäßbett in das alveoläre Kompartiment nachgewiesen werden (64,94). Dieses Mausmodell einer akuten pulmonalen Inflammation nach intratrachealer LPS-Gabe zeigt somit pathophysiologische Charakteristika des akuten Lungenversagens beim Menschen (5, 64). In diesem Modell wurde gezeigt, dass die Entzündungs-getriebene alveoläre Monozytenrekrutierung in den Alveolarraum strikt

CCR2-abhängig ist, da sowohl die genetische Deletion als auch die spezifische Blockade des CCR2-Rezeptors durch Applikation funktionsblockierender anti-CCR2-Antikörper eine nahezu 100%ige Hemmung des akut entzündlichen alveolären Monozyteneinstroms bewirkte (27, 39, 91, 95).

In dem in der Arbeit verwendete Mausmodell wurde zur Auslösung einer pulmonalen Inflammation 50µg hochaufgereinigtes Lipopolysaccharid intratracheal instilliert und eine Inflammation des Alveolarraumes induziert (77, 96). Das hier verwendete Mausmodell der Endotoxin-induzierten alveolären Inflammation war sehr gut reproduzierbar, benötigte nur eine einmalige Behandlung der Mäuse und ermöglichte durch die geringe Mortalitäts- und Komplikationsrate die Untersuchung über den gesamten Entzündungsverlauf von 120 Stunden, welcher sowohl die Initiierung als auch die Terminierung auf der Inflammation umfasste.

## **4.2 Einfluss unterschiedlicher LPS-Dosierungen auf den Verlauf der pulmonalen Inflammation**

Es wurden bereits verschiedene Mausmodelle des Endotoxin-induzierten Lungenversagens beschrieben, in den unterschiedliche Dosierungen von LPS zur Auslösung des Lungenschadens verwendet wurden (97-99). Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es in dem verwendeten Mausstamm eine LPS-Dosis zu ermitteln, die reproduzierbar ein alveoläres Entzündungsprofil auslöst, welches mit dem Entzündungsmuster der bronchoalveolären Lavage von Patienten mit ALI/ARDS vergleichbar ist. Hierzu wurde die Rekrutierungskinetik von neutrophilen Granulozyten und Exsudatmakrophagen in den Alveolarraum und die pulmonale Schrankenstörung zu verschiedenen Zeitpunkten nach intratrachealer LPS-Gabe evaluiert. Eine pulmonale Inflammation geht typischerweise mit einer frühen alveolären Neutrophilenrekrutierung einher (12, 64, 65, 100). Diese Arbeit bestätigt die vorbekannten Befunde mit einem signifikanten Anstieg der neutrophilen Granulozyten in der BALF beginnend 6 h nach LPS Gabe. Je höher die intratracheal applizierte Lipopolysaccharid-Dosis war, desto anhaltender und stärker war ist die alveoläre Rekrutierung neutrophiler Granulozyten. Neben der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten konnte eine verzögerte Migration von Monozyten aus dem Blut in den Alveolarraum gezeigt werden (11, 80, 101). Beim Vergleich verschiedener LPS-Dosen fanden sich signifikante Unterschiede in Beginn,

Ausmaß und Dauer der Rekrutierung von Exsudat Makrophagen in den Alveolarraum mit einem Rekrutierungsmaximum 48h nach LPS-Gabe.

In bronchoalveolären Lavagen unbehandelter Mäuse machen residente Alveolarmakrophagen den Hauptanteil der zellulären Bestandteile aus. Wie bereits von Maus et al. nachgewiesen wandern die Monozyten nach alveolärer Stimulation mit Endotoxin aus dem Blut in die Lunge und durchlaufen dort einen Differenzierungsprozess zu Alveolarmakrophagen (12, 65). Alveolarmakrophagen haben durch die Produktion von Chemokinen und Zytokinen sowie durch Phagozytose apoptotischer intraalveolärer Zellen eine wichtige Funktion für das lokale Abwehrsystem der Lunge (102). Daneben spielen auch im Verlauf der Entzündung rekrutierte Exsudatmakrophagen als Vorläufer von Alveolarmakrophagen im Kontext der Induktion und Terminierung von Inflammation sowie der Gewebsreparatur eine bedeutende Rolle. Nach einer Exposition der Wildtyp-Mäuse mit intratracheal instilliertem Lipopolysaccharid zeigten anschließende zeitlich engmaschige Untersuchungen der bronchoalveolären Lavagen eine anfangs langsame und später deutlichere Erhöhung der Anzahl der Alveolarmakrophagen.

Die alveolo-kapilläre Schrankenstörung der mit unterschiedlichen LPS-Dosen behandelte Wildtyp-Mäuse war wie bereits aus vorherigen Forschungen bekannt bei den niedrigeren LPS-Dosen geringer ausgeprägt. Nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS zeigten die Wildtyp-Mäuse nach 12h eine ausgeprägte pulmonale Schrankenstörung.

Ergänzend zu den zellulären Analysen der bronchoalveolären Lavagen wurden histologische Analysen des Lungengewebes bei verschiedenen LPS-Dosen durchgeführt. Auch hierbei war die pulmonale Inflammation bei der intratrachealen Applikation von 50µg LPS deutlicher ausgeprägt als bei niedrigeren LPS-Dosen.

Anhand dieser Ergebnisse wurde für die weiteren Experimente dieser Arbeit die intratracheale Instillation von 50µg LPS zur Induktion der pulmonalen Inflammation genutzt. Der Zeitpunkt 48h nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS wurde auf Grund der dann maximalen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Exsudatmakrophagen in den Alveolarraum präferentiell analysiert.

### **4.3 Einfluss verschiedener CCR2-exprimierender Zellpopulationen auf die pulmonale Inflammation**

Forschungen der letzten Jahre zeigen, dass die inflammatorische Rekrutierung von Monozyten in den Alveolarraum strikt abhängig ist von der Interaktion des Monozyten-rekrutierenden Chemokins CCL2 und dem monozytär exprimierten Rezeptor CCR2 (35, 40, 101, 103,104). Um auf die Rolle von CCR2-abhängig alveolär rekrutierten Monozyten im Entzündungsverlauf zu untersuchen, wurden vergleichende Experimente mit intratrachealer Instillation von 50µg LPS in CCR2-exprimierenden Wildtyp-Mäusen und CCR2-defizienten Mäusen durchgeführt .

Sowohl die Anzahl der der neutrophilen Granulozyten in der BALF, die alveolo-kapilläre Schrankenstörung als auch die Entzündungsreaktion in der histologischen Aufarbeitung des Lungenparenchyms war in CCR2-defizienten Mäusen signifikant stärker ausgeprägt als in Wildtyp Tieren. Diese Ergebnisse bestätigen Arbeiten von Amano et al, die ebenfalls zeigen, dass alveolär applizierte Stimuli bei CCL2-defizienten Mäusen eine deutlich stärkere pulmonale Inflammationen hervorrufen als in Wildtyp-tieren und häufiger tödlich ausgehen (60, 105). In den histologischen Aufarbeitungen des Lungengewebes 120h nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS fand sich bei den CCR2-defizienten Mäusen ein stärker geschädigtes Lungengewebe und ein ausgeprägteres Entzündungsinfiltrat als in Wildtyp Tieren. Ähnliche Befunde fanden auch Amano et al bei Einsatz von Anti-MCP-1/CCL2 Antikörpern in Wildtyp-tieren (60).

Um zu prüfen, ob der Unterschied in der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zwischen den CCR2-exprimierenden Wildtyp-Mäusen und den CCR2-defizienten Mäusen durch unterschiedliche Produktion neutrophilen-chemotaktischer Zytokine bedingt ist, wurde die Produktion der neutrophilen-chemotaktischen Zytokine KC und MIP-2 untersucht (106-108). Die KC und MIP-2 Spiegel in der BALF zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen CCR2-exprimierenden Wildtyp und den CCR2-defizienten Mäusen.

Der Nachweis einer verstärkten und prolongierten Inflammation bei weitgehend fehlender Rekrutierung von Exsudatmakrophagen in CCR2-defizienten Mäusen führte zu der Hypothese, dass CCR2-exprimierende Monozyten nicht nur wie bereits bekannt eine wichtige Rolle in der Induktion der pulmonalen Inflammation spielen (109), sondern auch an der Regulation des Ausmaßes der Inflammation beteiligt sind

Wie bereits in der Einleitung erläutert, gibt es außer Monozyten noch andere Zellen, die den Rezeptor CCR2 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Zu diesen gehören zum einen die Alveolarmakrophagen und zum anderen Lymphozyten, welche jedoch beide eine deutlich geringere Rezeptordichte auf ihrer Oberfläche präsentieren (30, 39, 60).

Um zu prüfen, ob zirkulierende Monozyten oder Lungen-residente Alveolarmakrophagen für den attenuierenden Effekt auf die Inflammation verantwortlich sind, wurde ein Knochenmarkschimären Modell etabliert und unter Nutzung des CD45.1/CD45.2 Alloantigensystems charakterisiert. Die Herstellung chimärer Mäuse erfolgte durch Transplantation von Knochenmark von WT oder CCR2 KO Spendertieren in letal bestrahlte Wildtyp-Tiere (80). Chimäre Mausmodelle mit anderen Spender- und Empfänger-Kombinationen sind auch von einer Reihe anderer Arbeitsgruppen genutzt worden (39, 49, 60). Hierbei zeigen sich auf Grund der verschiedenen Bestrahlungsregime mit unterschiedlichen Bestrahlungsdosen und Bestrahlungsquellen unterschiedliche Kurzzeit und Langzeit Transplantations-Effizienzen (110, 111). Für die hier beschriebenen Experimente mit intratrachealer LPS Gabe wurde ein Zeitpunkt evaluiert, an dem der Austausch der peripher zirkulierenden Monozyten vom Empfängertyp durch Monozyten vom Spendertyp nahezu vollständig erfolgt war, wohingegen der Austausch der Empfänger-Alveolarmakrophagen durch konstitutiv rekrutierte Monozyten vom Spendertyp noch gering ausgeprägt war. So zirkulierten in den chimären Tieren 2 Wochen nach Transplantation nahezu ausschließlich CD45.2 positive Spender Monozyten, während Lungen-residente Alveolarmakrophagen noch weitgehend einen CD45.1 Empfänger Phänotyp aufwiesen. Der Austausch der Alveolarmakrophagen vom CD45.1 Empfängertyp durch Alveolarmakrophagen vom CD45.2 Spendertyp durch konstitutive Migration mononukleärer Phagozyten in die Lunge erfolgte somit deutlich langsamer als der Austausch zirkulierender Blutzellen. Abhängig von der Konditionierung der Empfängertiere vor der Knochenmarktransplantation, insbesondere dem Bestrahlungsregime, welches in unterschiedlichem Ausmass eine pulmonale Inflammation induzieren kann, erfolgt der Austausch dieser Zellen über einen Zeitraum von 8 bis 24 Wochen (80,81). In dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Knochenmarkschimärenmodell wurden die Tiere 2 Wochen nach der Bestrahlung und Transplantation für die Experimente eingesetzt, um eine klare Diskriminierung zwischen zirkulierenden Blutzellen von Spendertyp und Lungen-residenten Makrophagen vom Empfängertyp zu gewährleisten. Unsere Untersuchungen im

Chimärenmodell haben die Abhängigkeit der Entzündungs-getriebenen alveolären Rekrutierung von Exsudatmakrophagen von der CCR2 Expression zirkulierender Monozyten und ihrer Vorläufer bestätigt. Während mit Wildtyp-Knochenmark transplantierte chimäre Mäuse eine mit Wildtyp Tieren vergleichbare alveoläre Rekrutierung von Exsudatmakrophagen nach LPS zeigen, fehlt die Entzündungs-getriebene Rekrutierung dieser Zellen in chimären Mäusen, die mit CCR2-defizientem Knochenmark transplantiert wurden ebenso wie in CCR2-defizienten Mäusen weitgehend. In CD 45.1 Empfänger-mäusen stehen nach letaler Bestrahlung und Transplantation von CD 45.2 Knochenmark zur Erneuerung ihres hämatopoetischen Zellsystems nur CD 45.2 exprimierende Zellen zur Verfügung stehen. Falls die CD 45.2 exprimierenden hämatopoetischen Spenderzellen von CCR2-defizienten Mäusen stammen, befinden sich im peripheren Blut dieser chimären Mäuse ausschließlich CCR2-defiziente CD 45.2 exprimierende Monozyten. Nach intratracheal instilliertem LPS erfolgt unter Wildtyp-Bedingungen eine Rekrutierung von CCR2-exprimierenden Exsudatmakrophagen in den Alveolarraum. Bei den chimären Mäusen mit CCR2-defizientem Knochenmark fehlt wie bei den CCR2-defizienten Mäusen die inflammatorische Rekrutierung von Exsudatmakrophagen in den Alveolarraum. Im Gegensatz zu den CCR2-defizienten Mäusen liegen bei den chimären Mäusen 2 Wochen nach Transplantation von CCR2-defizientem Knochenmark jedoch nahezu ausschließlich CCR2-exprimierende residente Alveolarmakrophagen vom Empfängertyp im Alveolarraum vor. Die Tatsache, dass auch in den chimären Mäusen eine verstärkte und verlängerte pulmonale Inflammation beobachtet wurde, belegt, dass die fehlende CCR2 Expression auf zirkulierenden Monozyten und ihren Vorläufern und damit die fehlende Rekrutierung dieser Zellen in den Alveolarraum und nicht die fehlende Expression von CCR2 auf residenten Alveolarmakrophagen für verstärkten Inflamationsprozess verantwortlich ist. Die Attenuierung der pulmonalen Inflammation in Wildtyp Tieren im Vergleich zu CCR2-defizienten Tieren wird demnach durch CCR2-exprimierende zirkulierende Monozyten und ihre Vorläufer und nicht durch CCR2-exprimierende residente Makrophagen vermittelt. Untersuchungen von Amano et al (60) haben in CCL2 defizienten Mäusen eine verstärkte pulmonale Inflammation nach LPS-Gabe nachgewiesen, die durch die exogene Gabe von CCL2 revertierbar war. Die Autoren haben als Mechanismus für die beobachtete antiinflammatorische und regenerative Wirkung des exogen applizierten CCL2 in CCL2-defizienten Tieren eine Wirkung von CCL2 auf CCR2-exprimierenden

Alveolarmakrophagen angenommen. Die von uns unter Nutzung CCR2-defizienter Mäuse und Knochenmarkschimären erhobenen Befunde sprechen hingegen eher für die Relevanz der Interaktion von CCL2 mit CCR2 auf zirkulierenden Monozyten im pulmonalen Inflamationsprozess. Ergänzend zum Chimären Modell wurden adoptive Transfer Experimente mit Transfusionen isolierter mononukleärer Zellen durchgeführt. CCR2-defizienten Mäusen wurden mononukleäre Zellen von CCR2-exprimierenden Wildtyp-Mäusen oder von CCR2-defizienten Mäusen intravenös transferiert. Bei CCR2-defizienten Mäusen fehlt CCR2 auf zirkulierenden Monozyten und ihren Vorläufern, was zu einer drastischen Reduktion der Entzündungs-getriebenen pulmonalen Rekrutierung von Exsudatmakrophagen führt. Nach Transfusion von CCR2 exprimierenden Monozyten aus Wildtyp Mäusen in CCR2-defiziente Mäuse findet in diesen Tieren eine mit Wildtypmäusen vergleichbare Migration von Exsudatmakrophagen in den Alveolarraum statt. Zusätzlich wiesen die CCR2-defizienten Mäuse nach Transfer von CCR2-exprimierenden mononukleären Zellen aus Wildtypmäusen eine signifikant geringere pulmonale Inflammation im Vergleich zu nicht transfundierten CCR2-defizienten Mäusen auf. Dieser Befund belegt das Konzept, dass CCR2-exprimierende Monozyten nach Migration in die Lunge Entzündungs-dämpfende und -terminierende Effekte ausüben. Lymphatische Zellen besitzen wie bereits erwähnt neben den Monozyten und den Makrophagen die Fähigkeit den Rezeptor CCR2 auf ihrer Oberfläche zu exprimieren (112). Eine Beteiligung dieser Zellen an der hier beobachteten Dämpfung der pulmonalen Entzündungsreaktion bei Wildtyp im Vergleich zu CCR2-defizienten Mäusen ist jedoch eher unwahrscheinlich. So fand sich kein signifikanter Unterschied im Anteil rekrutierter Lymphozyten zwischen bronchoalveolären Lavagen von Wildtyp-Mäusen und CCR2-defizienten Tieren. Ergänzend wurden auch die Lymphozyten der chimären Mäuse in den bronchoalveolären Lavagen analysiert. Auch bei dieser Analyse fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den chimären Maus-Gruppen.

#### **4.4 Einfluss einer Fraktalkine/Fraktalkine Rezeptor abhängigen Monozyten Migration auf den pulmonalen Entzündungsprozess**

Neben der CCR2/CCL2 abhängigen Rekrutierung wurde eine Fraktalkine/Fraktalkine-Rezeptor (CX<sub>3</sub>C/CX<sub>3</sub>CR)-abhängige Monozyten Migration ins Gewebe beschrieben (61, 66). In vergleichenden Untersuchungen an Wildtyp-Mäusen mit intakter CCR2/CCL2 und CX<sub>3</sub>CR/CX<sub>3</sub>C Achse, CCR2-defizienten Mäusen mit fehlender Expression des Chemokinrezeptors CCR2 und Fraktalkine-Rezeptor defizienten Tieren (CX<sub>3</sub>CR<sup>GFP/GFP</sup>), zeigten CCR2-defiziente Tiere wie oben beschrieben bei fehlender Rekrutierung von Exudatmakrophagen ein verstärktes pulmonales Inflammationsprofil nach intratrachealer LPS-Gabe. Demgegenüber fanden sich zwischen Fraktalkine-Rezeptor defizienten Tieren und Wildtyp Tieren keine signifikanten Unterschiede im zellulären BAL Profil, histologischem Entzündungsmuster und in der pulmonalen Schrankenfunktion. Demnach scheint die Fraktalkine/Fraktalkine-Rezeptor abhängige Monozytenmigration im LPS Modell nicht zur Attenuierung der pulmonalen Inflammation beizutragen.



#### **4.5 Zytokin-Genexpressionsprofil von zirkulierenden Monozyten und Exsudatmakrophagen nach intratrachealer LPS Instillation**

Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass inflammatorisch aus dem Gefäßsystem in den Alveolarraum rekrutierte Monozyten gegenüber zirkulierenden Monozyten ein verändertes Genexpressionsprofil (66) aufweisen. Um Kandidatenmoleküle zu identifizieren, die die von CCR2-exprimierenden alveolär rekrutierten Exsudatmakrophagen ausgeübte Entzündungshemmung vermitteln, wurde nach intratrachealer Instillation von 50µg LPS die Genexpression für eine Auswahl regulatorischer und antiinflammatorischer Zytokine in FACS-separierten zirkulierenden Monozyten und alveolär rekrutierten Exsudatmakrophagen mittels realtime RT-PCR verglichen. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede für TGFβ, HGF, KGF und IL-10 zwischen den untersuchten Zellpopulationen. Amano et al konnten demgegenüber in residenten Alveolarmakrophagen eine verstärkte Produktion von HGF unter inflammatorischen Bedingungen nachweisen (60).

Die alveolär-rekrutierten CCR2-exprimierenden Exsudatmakrophagen wiesen hingegen einen signifikant höheren IL-1-RA mRNA Spiegel auf als zirkulierende Monozyten. Dieses antiinflammatorische Zytokin ist damit ein Kandidatenmolekül als Mediator für die anti-inflammatorischen Effekte, die durch Exsudatmakrophagen vermittelt werden.

## 5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Experimente mit Wildtyp, Chemokin-Rezeptor gendefizienten und Knochenmarkschimären Mäusen mit sequentieller Analytik des zellulären BAL-Profiles, der Lungenhistologie und der pulmonalen Schrankenfunktion zeigen erstmals eine Entzündungs-dämpfende Funktion CCR2-exprimierender Monozyten/Exsudatmakrophagen im LPS-Modell der akuten pulmonalen Inflammation. Ein potentieller Mediator für diesen Effekt ist IL1RA, dessen Genexpression in Exsudatmakrophagen hochreguliert wird.

Weiterführende Arbeiten müssen klären, ob die Attenuierung der pulmonalen Inflammation durch Exsudatmakrophagen im LPS Modell und bei bakterieller Pneumonie in der Tat durch Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist vermittelt wird. Hierzu könnten Experimente mit exogen zugeführtem rekombinanten IL1RA und IL1-RA-defizienten Mäusen in Chimärenmodellen durchgeführt werden.

## 6 Zusammenfassung

Die pulmonale Entzündungsantwort im Rahmen einer Pneumonie ist einerseits essenziell für die Elimination von Pathogenen. Andererseits können Entzündungsvorgänge im hochsensiblen Lungenparenchym durch Gewebsschädigung die pulmonale Schrankenfunktion und den Gasaustausch schwerwiegend beeinträchtigen, bis hin zum akuten respiratorischen Distress Syndrom (ARDS). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von Exsudatmakrophagen, die im Verlauf der Inflammation neben neutrophilen Granulozyten durch Interaktion des Monozyten-rekrutierenden Chemokins CCL2 (MCP-1) mit seinem monozytär exprimierten Rezeptor CCR2 in den Alveolarraum rekrutiert werden, in der frühen und späten Entzündungsphase zu untersuchen. Hierzu wurde die durch intratracheale Instillation von LPS in verschiedener Dosierung in C57BL/6 Mäusen ausgelöste pulmonale Inflammation hinsichtlich des zellulären Entzündungsprofils (Differentialzytologie der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit, Lungenhistologie) und der pulmonalen Schrankenfunktion (Übertritt von FITC-Albumin aus der Gefäßbahn in den Alveolarraum) untersucht. In Wildtyptieren wurde der Entzündungsverlauf durch sequentielle Analysen über einen Zeitraum von 120 Stunden charakterisiert, welcher sowohl die Initiierung als auch die Terminierung der Entzündungsreaktion umfasste. Um die Rolle CCL2/CCR2-abhängig rekrutierter Exsudatmakrophagen für den durch Instillation von 50µg LPS induzierten Entzündungsverlauf zu definieren, wurde das zelluläre Entzündungsprofil in der bronchoalveolären Lavage und Lungenhistologie in Wildtyp Tieren und CCR2-defizienten Mäusen verglichen. Im Gegensatz zu Wildtyp Tieren zeigten CCR2-defiziente Mäuse wie erwartet nach Behandlung mit 50µg LPS nahezu keine alveoläre Rekrutierung von Exsudatmakrophagen. Interessanterweise waren in diesen Tieren hingegen die alveoläre Neutrophilenrekrutierung und die Entzündungsreaktion in der Lungenhistologie deutlich verstärkt und verlängert nachweisbar. Auch die pulmonale Schrankenstörung, gemessen als kapillo-alveolärer Übertritt von FITC-Albumin, war ausgeprägter und hielt länger an. Die Befunde sprechen für eine bislang unbekannte Entzündungs-attenuierende Funktion der CCL2/CCR2 Achse und der CCR2-abhängig rekrutierten Exsudatmakrophagen im Modell der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation. Die verstärkte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in CCR2-defizienten Tieren war nicht auf die erhöhte

alveoläre Freisetzung der Neutrophilen-rekrutierenden-Chemokine MIP-2 und KC zurückzuführen, da die quantitative Bestimmung dieser Zytokine in der BALF mittels ELISA keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp-Mäusen und CCR2-defizienten Mäusen ergab.

Um die Rolle von Exsudatmakrophagen, die Fraktakine/Fraktalkine-Rezeptor vermittelt pulmonal rekrutiert werden, zu untersuchen, wurden Fraktalkine-Rezeptor defiziente Mäuse mit Wildtyp- und CCR2-defizienten Tieren verglichen. Im Gegensatz zu CCR2-defizienten Tieren zeigten Fraktalkine-Rezeptor defiziente Mäuse keine verstärkte pulmonale Inflammation nach intratrachealer LPS-Gabe, sondern einen mit Wildtyp-Mäusen vergleichbaren Entzündungsverlauf. Somit ließ sich kein Entzündungsmodulierenden Effekt der Fraktalkine/Fraktalkine-Rezeptor Achse im verwendeten LPS-Modell nachweisen.

Um zu klären, ob der auf zirkulierenden Monozyten oder der auf residenten Alveolarmakrophagen exprimierte CCR2 für den Entzündungs-hemmenden Effekt im LPS Modell verantwortlich war, wurden Untersuchungen an chimären Wildtyp-Mäusen durchgeführt, denen nach letaler Bestrahlung CCR2-defizientes Spenderknochenmark transplantiert wurde. Bei diesen Tieren sind zwei Wochen nach Knochenmarkstransplantation die zirkulierenden Blutzellen durch CCR2-defiziente Spenderzellen ersetzt, während die residenten Alveolarmakrophagen noch einen CCR2-exprimierenden Empfängerphänotyp aufweisen. Diese chimären Wildtyp-Mäuse zeigten trotz intakter CCR2-Expression auf residenten Alveolarmakrophagen die gleiche verstärkte pulmonale Entzündungsreaktion wie CCR2-defiziente Mäuse mit fehlender CCR2-Expression auf residenten Alveolarmakrophagen. Somit ist für den Entzündungs-hemmenden Effekt im LPS-Modell nicht die Expression von CCR2 auf residenten Alveolarmakrophagen, sondern die CCR2 Expression auf zirkulierenden Zellen notwendig. Dies wurde durch Transfusionsexperimente von mononukleären peripheren Blutzellen mit intakter oder fehlender CCR2-Expression in CCR2-defiziente Tiere bestätigt. CCR2-defiziente Tiere, die CCR2-exprimierende Wildtyp Leukozyten erhielten, zeigten eine reduzierte und verkürzte pulmonale Inflammation, welche dem Verlauf in Wildtyp-Mäuse entsprach.

Um potentielle Mediatoren zu identifizieren, die den beobachteten anti-inflammatorischen Effekt von CCR2-abhängig rekrutierten Exsudatmakrophagen vermitteln, wurde die Genexpression ausgewählter Zytokine in FACS-separierten Blut Monozyten und Exsudatmakrophagen aus der bronchoalveolären Lavage verglichen,

wobei transgene CX3CR1<sup>+/GFP</sup>-Tiere mit endogener Fluoreszenzmarkierung mononukleärer Phagozyten für die hochreine Isolation dieser Zellen genutzt wurden. Exsudatmakrophagen zeigten sehr viel höhere mRNA Spiegel des Zytokins IL1-RA als zirkulierende Monozyten. Dieser endogene Antagonist von IL1 ist somit ein potentiellles Mediatormolekül, über welches CCR2-abhängig rekrutierte Exsudatmakrophagen ihre anti-inflammatorischen Effekte im untersuchten LPS-Modell vermitteln könnten.

## 7 Abstract

The lung inflammatory response is essential for pathogen clearance but may also induce lung tissue damage which severely affects lung barrier function and gas exchange which may lead to acute respiratory distress syndrome (ARDS). Central aim of the presented work was to define the role of exudate macrophages recruited to lung tissue by interaction of CCL2 with its receptor CCR2 during the early and late inflammation phase. Therefore the inflammatory response induced by intratracheal LPS application in C57BL/6 mice was analysed for inflammatory profiles (BALF cytopins, lung histology) and lung barrier function (FITC albumin leakage) sequentially for a 120h period which covered both inflammation initiation and termination.

To define the role of CCL2/CCR2-dependently recruited exudate macrophages for the inflammatory response induced by instillation of 50 µg LPS cellular BALF profiles and lung histologies in wildtype and CCR2-deficient mice largely lacking lung monocyte recruitment were compared. Strikingly, neutrophil recruitment to the alveolar space, inflammation in lung tissue evaluated by histology and lung barrier dysfunction analysed by FITC albumin leakage were heavily increased and prolonged in CCR2-deficient mice suggesting an attenuating role for CCL2/CCR2 dependend exudate macrophage recruitment during lung inflammation. The increased neutrophil recruitment observed in CCR2-deficient mice was not due to increased alveolar release of the neutrophil attracting chemokines MIP-2 and KC because quantification of these cytokines in BALF by ELISA revealed no differences between wildtype and CCR2-deficient mice.

In contrast to CCR2-deficient mice fractalkine-receptor deficient animals showed no increase in lung inflammation but displayed an inflammatory response comparable to wildtype mice indicating that fractalkine receptor depently recruited exudate macrophages have no inflammation modulating effect in this model of LPS induced lung injury.

To assess whether CCR2 expressed on circulating monocytes or on resident alveolar macrophages is critical for inflammation attenuation in the LPS model bone marrow chimeras were generated by transplanting CCR2-deficient donor bone marrow into lethally irradiated wildtype recipients. In these chimeric mice, circulating blood cells are replaced by CCR2-deficient donor cells two weeks after transplantation whereas

resident alveolar macrophages are still of recipient phenotype expressing intact CCR2. Like CCR2-deficient mice these chimeric animals showed severely increased lung inflammation despite intact CCR2-expression on resident alveolar macrophages indicating that monocyte expressed CCR2 is essential for attenuating lung inflammation. This was confirmed by transfusion of mononuclear blood cells with intact or lacking CCR2-expression into CCR2-deficient mice. Transfusion of CCR2-expressing wildtype blood cells completely attenuated exaggerated lung inflammation in CCR2 deficient animals to wildtype levels. To identify potential mediators for the observed anti-inflammatory effects of CCR2-dependently alveolar recruited exudate macrophages gene expression of selected cytokines in FACS separated blood monocytes and BALF exudate macrophages were compared by real time RT-PCR. Since gene expression of IL1-ra was drastically increased in exudate macrophages this endogenous antagonist of IL1 could be identified as a candidate molecule which might exert the anti-inflammatory effects of CCR2-dependently recruited exudate macrophages in LPS-induced lung injury.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Ebright, J. R., and M. W. Rytel. 1980. Bacterial pneumonia in the elderly. *J Am Geriatr Soc* 28:220-223.
2. Erickson, S. E., G. S. Martin, J. L. Davis, M. A. Matthay, and M. D. Eisner. 2009. Recent trends in acute lung injury mortality: 1996-2005. *Crit Care Med* 37:1574-1579.
3. Goodman, R. B., R. M. Strieter, D. P. Martin, K. P. Steinberg, J. A. Milberg, R. J. Maunder, S. L. Kunkel, A. Walz, L. D. Hudson, and T. R. Martin. 1996. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 154:602-611.
4. Yamamoto, T., O. Kajikawa, T. R. Martin, S. R. Sharar, J. M. Harlan, and R. K. Winn. 1998. The role of leukocyte emigration and IL-8 on the development of lipopolysaccharide-induced lung injury in rabbits. *J Immunol* 161:5704-5709.
5. Rosseau, S., P. Hammerl, U. Maus, H. D. Walmrath, H. Schutte, F. Grimminger, W. Seeger, and J. Lohmeyer. 2000. Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:25-35.
6. Miller, E. J., A. B. Cohen, S. Nagao, D. Griffith, R. J. Maunder, T. R. Martin, J. P. Weiner-Kronish, M. Sticherling, E. Christophers, and M. A. Matthay. 1992. Elevated levels of NAP-1/interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality. *Am Rev Respir Dis* 146:427-432.
7. Weiland, J. E., W. B. Davis, J. F. Holter, J. R. Mohammed, P. M. Dorinsky, and J. E. Gadek. 1986. Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. Clinical and pathophysiologic significance. *Am Rev Respir Dis* 133:218-225.
8. Robson, R. L., R. M. McLoughlin, J. Witowski, P. Loetscher, T. S. Wilkinson, S. A. Jones, and N. Topley. 2001. Differential regulation of chemokine production in human peritoneal mesothelial cells: IFN-gamma controls neutrophil migration across the mesothelium in vitro and in vivo. *J Immunol* 167:1028-1038.
9. Maus, U., J. Huwe, L. Ermert, M. Ermert, W. Seeger, and J. Lohmeyer. 2002. Molecular pathways of monocyte emigration into the alveolar air space of intact mice. *Am J Respir Crit Care Med* 165:95-100.
10. Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad, and K. Ley. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327:656-661.



11. Rosseau, S., J. Selhorst, K. Wiechmann, K. Leissner, U. Maus, K. Mayer, F. Grimminger, W. Seeger, and J. Lohmeyer. 2000. Monocyte migration through the alveolar epithelial barrier: adhesion molecule mechanisms and impact of chemokines. *J Immunol* 164:427-435.
12. Li, X. C., M. Miyasaka, and T. B. Issekutz. 1998. Blood monocyte migration to acute lung inflammation involves both CD11/CD18 and very late activation antigen-4-dependent and independent pathways. *J Immunol* 161:6258-6264.
13. Doerschuk, C. M., J. P. Mizgerd, H. Kubo, L. Qin, and T. Kumasaka. 1999. Adhesion molecules and cellular biomechanical changes in acute lung injury: Giles F. Filley Lecture. *Chest* 116:37-43.
14. Baggiolini, M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565-568.
15. Wells, T. N., C. A. Power, and A. E. Proudfoot. 1998. Definition, function and pathophysiological significance of chemokine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 19:376-380.
16. Mizgerd, J. P., B. H. Horwitz, H. C. Quillen, M. L. Scott, and C. M. Doerschuk. 1999. Effects of CD18 deficiency on the emigration of murine neutrophils during pneumonia. *J Immunol* 163:995-999.
17. Gouwy, M., S. Struyf, H. Verbeke, W. Put, P. Proost, G. Opdenakker, and J. Van Damme. 2009. CC chemokine ligand-2 synergizes with the nonchemokine G protein-coupled receptor ligand fMLP in monocyte chemotaxis, and it cooperates with the TLR ligand LPS via induction of CXCL8. *J Leukoc Biol* 86:671-680.
18. Baier, R. J., A. Majid, H. Parupia, J. Loggins, and T. E. Kruger. 2004. CC chemokine concentrations increase in respiratory distress syndrome and correlate with development of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 37:137-148.
19. Iyonaga, K., M. Takeya, N. Saita, O. Sakamoto, T. Yoshimura, M. Ando, and K. Takahashi. 1994. Monocyte chemoattractant protein-1 in idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial lung diseases. *Hum Pathol* 25:455-463.
20. Car, B. D., F. Meloni, M. Luisetti, G. Semenzato, G. Gialdroni-Grassi, and A. Walz. 1994. Elevated IL-8 and MCP-1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 149:655-659.
21. Sugiyama, Y., T. Kasahara, N. Mukaida, K. Matsushima, and S. Kitamura. 1995. Chemokines in bronchoalveolar lavage fluid in summer-type hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 8:1084-1090.

22. Flory, C. M., M. L. Jones, B. F. Miller, and J. S. Warren. 1995. Regulatory roles of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta in monocyte chemoattractant protein-1-mediated pulmonary granuloma formation in the rat. *Am J Pathol* 146:450-462.
23. Flory, C. M., M. L. Jones, and J. S. Warren. 1993. Pulmonary granuloma formation in the rat is partially dependent on monocyte chemoattractant protein 1. *Lab Invest* 69:396-404.
24. Holgate, S. T., K. S. Bodey, A. Janezic, A. J. Frew, A. P. Kaplan, and L. M. Teran. 1997. Release of RANTES, MIP-1 alpha, and MCP-1 into asthmatic airways following endobronchial allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 156:1377-1383.
25. Szalai, C., G. T. Kozma, A. Nagy, A. Bojszko, D. Krikovszky, T. Szabo, and A. Falus. 2001. Polymorphism in the gene regulatory region of MCP-1 is associated with asthma susceptibility and severity. *J Allergy Clin Immunol* 108:375-381.
26. Bossink, A. W., L. Paemen, P. M. Jansen, C. E. Hack, L. G. Thijs, and J. Van Damme. 1995. Plasma levels of the chemokines monocyte chemotactic proteins-1 and -2 are elevated in human sepsis. *Blood* 86:3841-3847.
27. Kuziel, W. A., S. J. Morgan, T. C. Dawson, S. Griffin, O. Smithies, K. Ley, and N. Maeda. 1997. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12053-12058.
28. Parry, C. M., J. P. Simas, V. P. Smith, C. A. Stewart, A. C. Minson, S. Efstathiou, and A. Alcamí. 2000. A broad spectrum secreted chemokine binding protein encoded by a herpesvirus. *J Exp Med* 191:573-578.
29. Proudfoot, A. E. 2002. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2:106-115.
30. Maus, U. A., M. A. Koay, T. Delbeck, M. Mack, M. Ermert, L. Ermert, T. S. Blackwell, J. W. Christman, D. Schlondorff, W. Seeger, and J. Lohmeyer. 2002. Role of resident alveolar macrophages in leukocyte traffic into the alveolar air space of intact mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:L1245-1252.
31. Ben-Baruch, A., D. F. Michiel, and J. J. Oppenheim. 1995. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J Biol Chem* 270:11703-11706.
32. Yoshimura, T., and E. J. Leonard. 1990. Secretion by human fibroblasts of monocyte chemoattractant protein-1, the product of gene JE. *J Immunol* 144:2377-2383.

33. Van Damme, J., P. Proost, W. Put, S. Arens, J. P. Lenaerts, R. Conings, G. Opdenakker, H. Heremans, and A. Billiau. 1994. Induction of monocyte chemotactic proteins MCP-1 and MCP-2 in human fibroblasts and leukocytes by cytokines and cytokine inducers. Chemical synthesis of MCP-2 and development of a specific RIA. *J Immunol* 152:5495-5502.
34. Locati, M., D. Zhou, W. Luini, V. Evangelista, A. Mantovani, and S. Sozzani. 1994. Rapid induction of arachidonic acid release by monocyte chemotactic protein-1 and related chemokines. Role of Ca<sup>2+</sup> influx, synergism with platelet-activating factor and significance for chemotaxis. *J Biol Chem* 269:4746-4753.
35. Gunn, M. D., N. A. Nelken, X. Liao, and L. T. Williams. 1997. Monocyte chemoattractant protein-1 is sufficient for the chemotaxis of monocytes and lymphocytes in transgenic mice but requires an additional stimulus for inflammatory activation. *J Immunol* 158:376-383.
36. Muller, W. A. 2001. New mechanisms and pathways for monocyte recruitment. *J Exp Med* 194:F47-51.
37. Carr, M. W., S. J. Roth, E. Luther, S. S. Rose, and T. A. Springer. 1994. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3652-3656.
38. Grewal, I. S., B. J. Rutledge, J. A. Fiorillo, L. Gu, R. P. Gladue, R. A. Flavell, and B. J. Rollins. 1997. Transgenic monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in pancreatic islets produces monocyte-rich insulitis without diabetes: abrogation by a second transgene expressing systemic MCP-1. *J Immunol* 159:401-408.
39. Mack, M., J. Cihak, C. Simonis, B. Luckow, A. E. Proudfoot, J. Plachy, H. Bruhl, M. Frink, H. J. Anders, V. Vielhauer, J. Pfirstinger, M. Stangassinger, and D. Schlondorff. 2001. Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J Immunol* 166:4697-4704.
40. Fuentes, M. E., S. K. Durham, M. R. Swerdel, A. C. Lewin, D. S. Barton, J. R. Megill, R. Bravo, and S. A. Lira. 1995. Controlled recruitment of monocytes and macrophages to specific organs through transgenic expression of monocyte chemoattractant protein-1. *J Immunol* 155:5769-5776.
41. Warren, J. S., M. L. Jones, and C. M. Flory. 1993. Analysis of monocyte chemoattractant protein 1-mediated lung injury using rat lung organ cultures. *Am J Pathol* 143:894-906.
42. Rollins, B. J., A. Walz, and M. Baggiolini. 1991. Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood* 78:1112-1116.

43. Jiang, Y., D. I. Beller, G. Frendl, and D. T. Graves. 1992. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* 148:2423-2428.
44. Vaddi, K., and R. C. Newton. 1994. Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines. *J Immunol* 153:4721-4732.
45. Nakamura, K., I. R. Williams, and T. S. Kupper. 1995. Keratinocyte-derived monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1): analysis in a transgenic model demonstrates MCP-1 can recruit dendritic and Langerhans cells to skin. *J Invest Dermatol* 105:635-643.
46. Allavena, P., G. Bianchi, D. Zhou, J. van Damme, P. Jilek, S. Sozzani, and A. Mantovani. 1994. Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3. *Eur J Immunol* 24:3233-3236.
47. Penton-Rol, G., N. Polentarutti, W. Luini, A. Borsatti, R. Mancinelli, A. Sica, S. Sozzani, and A. Mantovani. 1998. Selective inhibition of expression of the chemokine receptor CCR2 in human monocytes by IFN-gamma. *J Immunol* 160:3869-3873.
48. Xu, L., R. Rahimpour, L. Ran, C. Kong, A. Biragyn, J. Andrews, M. Devries, J. M. Wang, and D. J. Kelvin. 1997. Regulation of CCR2 chemokine receptor mRNA stability. *J Leukoc Biol* 62:653-660.
49. Maus, U., K. von Grote, W. A. Kuziel, M. Mack, E. J. Miller, J. Cihak, M. Stangassinger, R. Maus, D. Schlondorff, W. Seeger, and J. Lohmeyer. 2002. The role of CC chemokine receptor 2 in alveolar monocyte and neutrophil immigration in intact mice. *Am J Respir Crit Care Med* 166:268-273.
50. Territo, M. C., and M. J. Cline. 1975. Mononuclear phagocyte proliferation, maturation and function. *Clin Haematol* 4:685-703.
51. Forkner, C. E. 1930. The Origin of Monocytes in Certain Lymph Nodes and Their Genetic Relation to Other Connective Tissue Cells. *J Exp Med* 52:385-404.
52. Geissmann, F., C. Auffray, R. Palframan, C. Wirrig, A. Ciocca, L. Campisi, E. Narni-Mancinelli, and G. Lauvau. 2008. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol* 86:398-408.
53. Harris, P., and P. Ralph. 1985. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J Leukoc Biol* 37:407-422.

54. Lohmann-Matthes, M. L., W. Domzig, and J. Roder. 1979. Promonocytes have the functional characteristics of natural killer cells. *J Immunol* 123:1883-1886.
55. van oud Alblas, A. B., and R. van Furth. 1979. Origin, Kinetics, and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. *J Exp Med* 149:1504-1518.
56. Riches, D. W., and P. M. Henson. 1986. Functional aspects of mononuclear phagocyte involvement in lung inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 465:6-14.
57. Golde, D. W., and L. A. Byers. 1975. Proliferation and maturation of human leukemia cells in liquid culture. *Bibl Haematol*:243-250.
58. Ohta, H., and K. Shimizu. 1975. Maturation and interrelationship of mouse mononuclear phagocytes in bone marrow, peripheral blood and peritoneal cavity in terms of erythrophagocytic activity. *Tohoku J Exp Med* 116:111-125.
59. Blusse van Oud Alblas, A., and R. van Furth. 1982. The origin of pulmonary macrophages. *Immunobiology* 161:186-192.
60. Amano, H., K. Morimoto, M. Senba, H. Wang, Y. Ishida, A. Kumatori, H. Yoshimine, K. Oishi, N. Mukaida, and T. Nagatake. 2004. Essential contribution of monocyte chemoattractant protein-1/C-C chemokine ligand-2 to resolution and repair processes in acute bacterial pneumonia. *J Immunol* 172:398-409.
61. Srivastava, M., S. Jung, J. Wilhelm, L. Fink, F. Buhling, T. Welte, R. M. Bohle, W. Seeger, J. Lohmeyer, and U. A. Maus. 2005. The inflammatory versus constitutive trafficking of mononuclear phagocytes into the alveolar space of mice is associated with drastic changes in their gene expression profiles. *J Immunol* 175:1884-1893.
62. Savill, J. S., A. H. Wyllie, J. E. Henson, M. J. Walport, P. M. Henson, and C. Haslett. 1989. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 83:865-875.
63. Savill, J., J. Smith, C. Sarraf, Y. Ren, F. Abbott, and A. Rees. 1992. Glomerular mesangial cells and inflammatory macrophages ingest neutrophils undergoing apoptosis. *Kidney int* 42:924-936.
64. Maus, U., J. Huwe, R. Maus, W. Seeger, and J. Lohmeyer. 2001. Alveolar JE/MCP-1 and endotoxin synergize to provoke lung cytokine upregulation, sequential neutrophil and monocyte influx, and vascular leakage in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 164:406-411.

65. Maus, U., S. Herold, H. Muth, R. Maus, L. Ermert, M. Ermert, N. Weissmann, S. Rosseau, W. Seeger, F. Grimminger, and J. Lohmeyer. 2001. Monocytes recruited into the alveolar air space of mice show a monocytic phenotype but upregulate CD14. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:L58-68.
66. Geissmann, F., S. Jung, and D. R. Littman. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19:71-82.
67. Maus, U. A., S. Janzen, G. Wall, M. Srivastava, T. S. Blackwell, J. W. Christman, W. Seeger, T. Welte, and J. Lohmeyer. 2006. Resident alveolar macrophages are replaced by recruited monocytes in response to endotoxin-induced lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35:227-235.
68. Almdahl, S. M., and B. Osterud. 1987. Effect of antibiotics on gram-negative sepsis in the rat. Lack of endotoxin burst. *Acta Chir Scand* 153:283-286.
69. Parodi, S., and M. Bidwell Goetz. 2002. Aerobic Gram-negative Bacillary Pneumonia. *Curr Infect Dis Rep* 4:249-256.
70. Lerner, A. M. 1980. The gram-negative bacillary pneumonias. *Dis Mon* 27:1-56.
71. Karnad, A., S. Alvarez, and S. L. Berk. 1985. Pneumonia caused by gram-negative bacilli. *Am J Med* 79:61-67.
72. Bodey, G. P., V. Rodriguez, M. Valdivieso, and M. Keating. 1977. Gram-negative bacillary infections in cancer patients. *S Afr Med J* 52:1049-1055.
73. Pachon, J., M. D. Prados, F. Capote, J. A. Cuello, J. Garnacho, and A. Verano. 1990. Severe community-acquired pneumonia. Etiology, prognosis, and treatment. *Am Rev Respir Dis* 142:369-373.
74. Schutte, H., S. Rosseau, R. Czymek, L. Ermert, D. Walmrath, H. J. Kramer, W. Seeger, and F. Grimminger. 1997. Synergism between endotoxin priming and exotoxin challenge in provoking severe vascular leakage in rabbit lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 156:819-824.
75. Vinokurov, M. G., M. M. Yurinskaya, I. R. Prokhorenko, and S. V. Grachev. 2006. Effect of various E. coli LPS chemotypes on apoptosis and activation of human neutrophils. *Bull Exp Biol Med* 142:173-175.
76. Vorobeva, E. V., I. N. Krasikova, and T. F. Solov'eva. 2006. Influence of lipopolysaccharides and lipids A from some marine bacteria on spontaneous and Escherichia coli LPS-induced TNF-alpha release from peripheral human blood cells. *Biochemistry (Mosc)* 71:759-766.

77. Miller, D. L., K. Welty-Wolf, M. S. Carraway, M. Ezban, A. Ghio, H. Suliman, and C. A. Piantadosi. 2002. Extrinsic coagulation blockade attenuates lung injury and proinflammatory cytokine release after intratracheal lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26:650-658.
78. Combadiere, C., D. Potteaux, J. L. Gao, B. Esposito, S. Casanova, E. J. Lee, P. Debre, A. Tedgui, P. M. Murphy and Z. Mallat. 2003. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3/CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation* 107: 1009-1016
79. Jung, S., J. Aliberti, P. Graemmel, M. J. Sunshine, G. W. Kreutzberg, A. Sher, and D. R. Littman. 2000. Analysis of fractalkine receptor CX3CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 20: 4106 – 4114
80. Maus, U. A., K. Waelsch, W. A. Kuziel, T. Delbeck, M. Mack, T. S. Blackwell, J. W. Christman, D. Schlondorff, W. Seeger, and J. Lohmeyer. 2003. Monocytes are potent facilitators of alveolar neutrophil emigration during lung inflammation: role of the CCL2-CCR2 axis. *J Immunol* 170:3273-3278.
81. Maus, U. A., S. Wellmann, C. Hampl, W. A. Kuziel, M. Srivastava, M. Mack, M. B. Everhart, T. S. Blackwell, J. W. Christman, D. Schlondorff, R. M. Bohle, W. Seeger, and J. Lohmeyer. 2005. CCR2-positive monocytes recruited to inflamed lungs downregulate local CCL2 chemokine levels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288:L350-358.
82. Fink, L., W. Seeger, L. Ermert, J. Hanze, U. Stahl, F. Grimminger, W. Kummer, and R. M. Bohle. 1998. Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med* 4:1329-1333.
83. Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
84. Bastarache, J. A., and T. S. Blackwell. 2009. Development of animal models for the acute respiratory distress syndrome. *Dis Model Mech* 2:218-223.
85. Tsushima, K., L. S. King, N. R. Aggarwal, A. De Gorordo, F. R. D'Alessio, and K. Kubo. 2009. Acute lung injury review. *Intern Med* 48:621-630.
86. Liu, D. D., Y. H. Hsu, and H. I. Chen. 2007. Endotoxin-induced acute lung injury is enhanced in rats with spontaneous hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:61-69.
87. Rubenfeld, G. D., and M. S. Herridge. 2007. Epidemiology and outcomes of acute lung injury. *Chest* 131:554-562.

88. Rinaldo, J. E., J. E. Henson, J. H. Dauber, and P. M. Henson. 1985. Role of alveolar macrophages in endotoxin-induced neutrophilic alveolitis in rats. *Tissue Cell* 17:461-472.
89. Winter, C., K. Taut, M. Srivastava, F. Langer, M. Mack, D. E. Briles, J. C. Paton, R. Maus, T. Welte, M. D. Gunn, and U. A. Maus. 2007. Lung-specific overexpression of CC chemokine ligand (CCL) 2 enhances the host defense to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice: role of the CCL2-CCR2 axis. *J Immunol* 178:5828-5838.
90. Winter, C., W. Herbold, R. Maus, F. Langer, D. E. Briles, J. C. Paton, T. Welte, and U. A. Maus. 2009. Important role for CC chemokine ligand 2-dependent lung mononuclear phagocyte recruitment to inhibit sepsis in mice infected with *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* 182:4931-4937.
91. Dawson, T. C., M. A. Beck, W. A. Kuziel, F. Henderson, and N. Maeda. 2000. Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus. *Am J Pathol* 156:1951-1959.
92. Schmitt, A., J. Guichard, J. M. Masse, N. Debili, and E. M. Cramer. 2001. Of mice and men: comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets. *Exp Hematol* 29:1295-1302.
93. Jouanguy, E., R. Doffinger, S. Dupuis, A. Pallier, F. Altare, and J. L. Casanova. 1999. IL-12 and IFN-gamma in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. *Curr Opin Immunol* 11:346-351.
94. Ware, L. B., and M. A. Matthay. 2000. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342:1334-1349.
95. Boring, L., J. Gosling, S. W. Chensue, S. L. Kunkel, R. V. Farese, Jr., H. E. Broxmeyer, and I. F. Charo. 1997. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest* 100:2552-2561.
96. McClenahan, D., K. Hellenbrand, D. Atapattu, N. Aulik, D. Carlton, A. Kapur, and C. Czuprynski. 2008. Effects of lipopolysaccharide and Mannheimia haemolytica leukotoxin on bovine lung microvascular endothelial cells and alveolar epithelial cells. *Clin Vaccine Immunol* 15:338-347.
97. Moon, C., J. R. Han, H. J. Park, J. S. Hah, and J. L. Kang. 2009. Synthetic RGDS peptide attenuates lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation by inhibiting integrin signaled MAP kinase pathways. *Respir Res* 10:18.



98. Chen, J., X. Liu, Q. Shu, S. Li, and F. Luo. 2008. Ghrelin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury through NO pathway. *Med Sci Monit* 14:BR141-146.
99. Lorenzoni, A. G., and R. F. Wideman, Jr. 2008. Intratracheal administration of bacterial lipopolysaccharide elicits pulmonary hypertension in broilers with primed airways. *Poult Sci* 87:645-654.
100. Ulich, T. R., L. R. Watson, S. M. Yin, K. Z. Guo, P. Wang, H. Thang, and J. del Castillo. 1991. The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. I. Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1-, and TNF-induced inflammatory infiltrate. *Am J Pathol* 138:1485-1496.
101. Rollins, B. J. 1996. Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol Med Today* 2:198-204.
102. Hunter, M., Y. Wang, T. Eubank, C. Baran, P. Nana-Sinkam, and C. Marsh. 2009. Survival of monocytes and macrophages and their role in health and disease. *Front Biosci* 14:4079-4102.
103. Lu, B., B. J. Rutledge, L. Gu, J. Fiorillo, N. W. Lukacs, S. L. Kunkel, R. North, C. Gerard, and B. J. Rollins. 1998. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med* 187:601-608.
104. Tsou, C. L., W. Peters, Y. Si, S. Slaymaker, A. M. Aslanian, S. P. Weisberg, M. Mack, and I. F. Charo. 2007. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 117:902-909.
105. Peters, W., J. G. Cyster, M. Mack, D. Schlondorff, A. J. Wolf, J. D. Ernst, and I. F. Charo. 2004. CCR2-dependent trafficking of F4/80dim macrophages and CD11cdim/intermediate dendritic cells is crucial for T cell recruitment to lungs infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 172:7647-7653.
106. Call, D. R., J. A. Nemzek, S. J. Ebong, G. R. Bolgos, D. E. Newcomb, G. K. Wollenberg, and D. G. Remick. 2001. Differential local and systemic regulation of the murine chemokines KC and MIP2. *Shock* 15:278-284.
107. Lomas, J. L., C. S. Chung, P. S. Grutkoski, B. W. LeBlanc, L. Lavigne, J. Reichner, S. H. Gregory, L. A. Doughty, W. G. Cioffi, and A. Ayala. 2003. Differential effects of macrophage inflammatory chemokine-2 and keratinocyte-derived chemokine on hemorrhage-induced neutrophil priming for lung inflammation: assessment by adoptive cells transfer in mice. *Shock* 19:358-365.

108. Shahangian, A., E. K. Chow, X. Tian, J. R. Kang, A. Ghaffari, S. Y. Liu, J. A. Belperio, G. Cheng, and J. C. Deng. 2009. Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice. *J Clin Invest* 119:1910-1920.
109. Lee, T. H. 1987. Interactions between alveolar macrophages, monocytes, and granulocytes. Implications for airway inflammation. *Am Rev Respir Dis* 135:14-17.
110. Chinnery, H. R., T. Humphries, A. Clare, A. E. Dixon, K. Howes, C. B. Moran, D. Scott, M. Zakrzewski, E. Pearlman, and P. G. McMenamin. 2008. Turnover of bone marrow-derived cells in the irradiated mouse cornea. *Immunology* 125:541-548.
111. Taut, K., C. Winter, D. E. Briles, J. C. Paton, J. W. Christman, R. Maus, R. Baumann, T. Welte, and U. A. Maus. 2008. Macrophage Turnover Kinetics in the Lungs of Mice Infected with *Streptococcus pneumoniae*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38:105-113.
112. Nureki, S. I., E. Miyazaki, Y. Usagawa, T. Ueno, M. Ando, R. Takenaka, T. Ito, T. Ishii, and T. Kumamoto. 2009. Elevated Concentrations of Liver-Expressed Chemokine/CC Chemokine Ligand 16 in Bronchoalveolar Lavage Fluid from Patients with Eosinophilic Pneumonia. *Int Arch Allergy Immunol* 150:282-290.

## **9 Anhang**

### **9.1 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. J. Lohmeyer danke ich für die Überlassung des Themas und für die gute und engagierte Betreuung.

Herrn Dr. med. M. Steinmüller möchte ich meinen herzlichen Dank für die hervorragende experimentelle Betreuung dieser Arbeit aussprechen. Seine stete Bereitschaft zur Diskussion wie auch Mitteilung seines fachlichen Wissens haben zusätzlich zum engagierten Interesse am Fortgang dieser Arbeit, diese in hohem Maße geprägt.

Dem gesamten Team des infektiologischen/pulmonologischen Labors möchte ich ebenfalls für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft danken.

Ein besonderer Dank gebührt den radiologischen Kollegen und den Röntgen-Assistenten, die mir mit Rat und Tat bei den Knochenmarksbestrahlungen zur Seite standen.

Zuletzt danke ich meiner lieben Familie für ihre freundliche und geduldige Unterstützung dieser Arbeit.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**

### **9.3 Veröffentlichung**

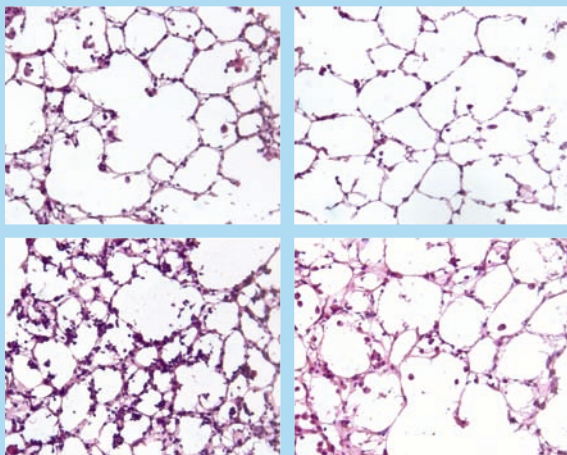
Herold, S., T. Shafiei Tabar, H. Janssen, K. Hoegner, M. Cabanski, P. Lewe-Schlosser, J. Albrecht, F. Driever, I. Vadasz, W. Seeger, M. Steinmueller, and J. Lohmeyer. 2011. Exudate macrophages attenuate lung injury by the release of IL-1 receptor antagonist in gram-negative pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 183:1380-1390.

## **9.4 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Tannaz Shafiei Tabar

Gießen, den 25.02.2013



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6119-7



9 783835 196119 7